



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του  
Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας**

**«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ –  
ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ, ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ»**

---

**Προσδιορισμός της  
φυσικής κατάστασης του  
γονιδιώματος του HPV-16  
μέσω ποσοτικού  
προσδιορισμού του λόγου  
των τιμών των γονιδίων  
E1/E6 και E2/E6**

---

**Πετρογιαννάκης Γεώργιος**

---

**Λάρισα, 2015**

---

**«Προσδιορισμός της φυσικής κατάστασης του  
γονιδιώματος του HPV-16 μέσω ποσοτικού προσδιορισμού  
του λόγου των τιμών των γονιδίων E1/E6 και E2/E6»**

«Determination of HPV-16 physical status through E1/E6  
and E2/E6 copy number ratio analysis».

### **Τριμελής επιτροπή αξιολόγησης:**

**Μαρκουλάτος Παναγιώτης:** Καθηγητής Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας με έμφαση στη Βιοτεχνολογία, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας (**Επιβλέπων**)

**Μόσιαλος Δημήτριος:** Επίκουρος Καθηγητής Βιοτεχνολογίας Μικροβίων, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

**Αμούτζιας Γρηγόριος:** Επίκουρος Καθηγητής Βιοπληροφορικής στη Γενωμική, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

## Πρόλογος

Θεωρώ χρέος μου και επιθυμώ, προλογίζοντας την παρούσα εργασία, να ευχαριστήσω ανθρώπους, η συμβολή των οποίων ήταν άκρως σημαντική για την ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας μου. Κατά κύριο λόγο, ευχαριστώ τον καθηγητή και επιβλέποντα μου, κύριο Μαρκουλάτο Παναγιώτη για την εμπιστοσύνη του, την υπομονή και το ενδιαφέρον του κατά την εκπόνηση της εργασίας. Εν συνεχεία, ευχαριστώ ιδιαίτερος τον διδάκτορα Τσακογιάννη Δημήτριο για την όλη συνεργασία που είχαμε και για την πολύτιμη βοήθεια του κατά την πραγματοποίηση των πειραμάτων. Ακόμη, πολλές ευχαριστίες οφείλω και στον υποψήφιο διδάκτορα Δημητρίου Τηλέμαχο για την υπομονή και τις πραγματικά εύστοχες παρατηρήσεις και συμβουλές του, στην Μπλέτσα Μαγδαληνή καθώς και στους υπόλοιπους «συναδέλφους» την περίοδο των πειραμάτων για την άψογη συνεργασία και το ιδιαίτερα ευχάριστο και φιλικό κλίμα που προσέδιδαν στον εργασιακό χώρο. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής της μεταπτυχιακής μου εργασίας, τον κύριο Αμούτζια Γρηγόριο και τον κύριο Μόσιαλο Δημήτριο.

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	
Περίληψη .....	7
Abstract .....	8
A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
1. Ιστορικά στοιχεία – αναδρομή .....	9
2. Ταξινόμηση των Papilloma ιών .....	10
3. Δομή των Human Papillomaviruses (HPVs) .....	13
3.1. Δομή του καψιδίου .....	13
3.2. Οργάνωση του γονιδιώματος .....	15
4. Πρώιμες ιικές πρωτεΐνες .....	17
4.1 Πρωτεΐνη E1 .....	17
4.2. Πρωτεΐνη E2 .....	18
4.3. Πρωτεΐνη E4 .....	20
4.4. Πρωτεΐνη E5 .....	20
4.5. Πρωτεΐνη E6 .....	22
4.6. Πρωτεΐνη E7 .....	24
5. Κύκλος ζωής του ιού .....	27
5.1. Είσοδος στο κύτταρο του ξενιστή .....	27
5.2. Αντιγραφή του ιού .....	28
5.3. Μεταγραφή ιικού γονιδιώματος, συναρμολόγηση και απελευθέρωση ιοσωματίων .....	29
6. Φυσική κατάσταση του ιικού γονιδιώματος .....	31

6.1. Μορφές του γοδιώματος .....	31
6.2. Θέσεις ενσωμάτωσης .....	33
6.3. Προσδιορισμός φυσικής κατάστασης του ιού .....	35
B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....	37
1. Κλινικά δείγματα τραχήλου της μήτρας .....	37
2. Απομόνωση DNA .....	37
2.1 Απομόνωση από ThinPrep .....	37
2.2. Απομόνωση από παραφίνη .....	38
3. Ηλεκτροφόρηση .....	39
4. Κατασκευή πλασμιδίων .....	39
4.1. Κατασκευή του pE6-E2 .....	40
4.2. Κατασκευή pGAPDH και pE6 .....	41
5. Χαρτογράφηση των E1 και E2 γονιδίων .....	41
6. Προσδιορισμός της μορφής γονιδιώματος του HPV16 .....	42
6.1. PCR Πραγματικού Χρόνου (Real Time PCR) .....	42
6.2. Καθορισμός του εύρους των τιμών E1/E6 και E2/E6 .....	45
6.3. Στατιστική μελέτη των αποτελεσμάτων .....	45
Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	46
1. Χαρτογράφηση των γονιδίων E1 και E2 .....	46
2. Καθορισμός του εύρους των τιμών E2/E6 και E1/E6 .....	47
3. Ανάλυση των τιμών των E1/E6, E2/E6 .....	48
3.1. Προσδιορισμός των E1/E6, E2/E6 .....	48
3.2. Συγκριτικά αποτελέσματα των τιμών E1/E6 και E2/E6 .....	52
Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	54
Ε. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ .....	58

## Περίληψη

Η ενσωμάτωση του γονιδιώματος του HPV-16 στο κυτταρικό γονιδίωμα αποτελεί ένα καθοριστικό στάδιο στον κύκλο ζωής του ιού καθώς επίσης και ένα κρίσιμο βήμα στην πορεία της καρκινογένεσης. Η ενσωμάτωση του HPV-16 DNA προάγει την υπερέκφραση των ογκογονιδίων E6 και E7, οδηγώντας στον εκτεταμένο πολλαπλασιασμό των μολυσμένων επιθηλιακών κυττάρων.

Στην παρούσα εργασία, μελετήθηκε η φυσική κατάσταση του γονιδιώματος του HPV-16 μέσω του ποσοτικού προσδιορισμού του λόγου των γονιδίων E1/E6 και E2/E6. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε 61 κλινικά τραχηλικά δείγματα (θετικά για μόλυνση με HPV-16), χαμηλού και υψηλού βαθμού δυσπλασίας, καθώς και σε 8 περιπτώσεις καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Για τον προσδιορισμό της μορφής του γονιδιώματος του ιού χρησιμοποιήθηκαν οι πιο κοινές θέσεις ρήξης των γονιδίων E1 και E2, οι οποίες προέκυψαν μετά από χαρτογράφηση.

Η ανάλυση της φυσικής κατάστασης του HPV-16 DNA αποκάλυψε μια σημαντική συσχέτιση μεταξύ των μορφών του γονιδιώματος και την ύπαρξη χαμηλού και υψηλού βαθμού τραχηλικής δυσπλασίας. Συγκριτική ανάλυση των λόγων E1/E6 και E2/E6 στα ίδια δείγματα, παρέχει μια ακριβέστερη εικόνα της μορφής του γονιδιώματος του ιού. Συμπερασματικά, προτείνεται ότι οι λόγοι των γονιδίων E1/E6 και E2/E6 μπορούν να προσδιορίσουν με ακρίβεια την φυσική κατάσταση του ιού και κατ' επέκταση να προβλέψουν πολλαπλά γεγονότα ενσωμάτωσης στα εξεταζόμενα δείγματα, παρέχοντας έτσι σημαντικές πληροφορίες σχετικά με την εξέλιξη της τραχηλικής δυσπλασίας.

## Abstract

HPV-16 genome integration into the host genome constitutes a crucial event during the virus life cycle and a major step towards carcinogenesis. The integration of HPV-16 DNA promotes a constitutive high expression level of E6 and E7 oncoproteins, resulting in the extensive proliferation of the infected epithelial cells.

In the present study, the physical status of the HPV-16 genome was investigated, through the determination of E1/E6 and E2/E6 copy number ratios in 61 cervical samples of low- and high-grade malignancy and in 8 cervical cancer samples, all of which were HPV16 positive. The selection of E1, E2 and E6 amplification target regions was performed according to the most prevalent deleted/disrupted sites of E1 and E2 genes.

The analysis of the HPV-16 DNA form revealed a significant association of the mixed DNA forms (integrated and episomal) in low-grade and high-grade malignancies. The comparative analysis of E1/E6 and E2/E6 in the same cervical samples provides an accurate description of HPV-16 DNA form and may reveal whether different integrants coexist in the same cervical sample or not. This study proposes that E1/E6 and E2/E6 ratios may determine with accuracy the HPV-16 DNA integration pattern and may predict multiple integration events in the examined sample, thus providing significant information about the progression of cervical dysplasia.



# A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1. Ιστορικά στοιχεία – αναδρομή

Οι ιοί των Θηλωμάτων – Papillomaviruses (PVs) αποτελούν μια μεγάλη ομάδα DNA ιών, οι οποίοι προσβάλλουν το δέρμα και τις βλεννογόνες μεμβράνες ανθρώπων και ορισμένων ζώων. Προκαλούν μια ευρεία ποικιλία συμπτωμάτων που κυμαίνονται από καλοήθεις αλλοιώσεις, γνωστές ως κονδυλώματα, έως και περιπτώσεις καρκίνου. Ανήκουν στην ευρύτερη οικογένεια των *Papillomaviridae* και το όνομά τους προέρχεται από την λατινική λέξη «papilla» (θηλή) και την ελληνική κατάληξη «-oma» (όγκος). Μέχρι στιγμής έχουν αναγνωριστεί 240 διαφορετικοί τύποι του ιού των Θηλωμάτων εκ των οποίων οι 170 τύποι προσβάλλουν τον άνθρωπο (HPVs) (de Villiers, 2013).

Αν και τα κονδυλώματα ήταν ήδη γνωστά στους αρχαίους Έλληνες και Ρωμαίους, η πρώτη επίσημη αναφορά σχετικά με την μολυσματική φύση των PVs, καταγράφηκε στην Ιταλία το 1907. Ο Ciuffo, χρησιμοποιώντας φίλτρα με τα οποία απομόνωναν βακτήρια, παρατήρησε ότι τα ανθρώπινα δερματικά θηλώματα μπορούσαν να μεταδοθούν από έναν ασθενή σε έναν άλλον (Ciuffo, 1907).

Ωστόσο, εκείνη την εποχή τα κονδυλώματα δεν είχαν ακόμη συσχετιστεί με τον σχηματισμό όγκων. Η εξακρίβωση του ογκογόνου δυναμικού των ιών των Θηλωμάτων πραγματοποιήθηκε το 1933 από τον Richard Shope. Ο ιός Shope Papillomavirus, γνωστός και ως CRPV (cottontail rabbit papillomavirus), αποτελεί τον πρώτο ογκογόνο DNA ιό που απομονώθηκε και βρέθηκε ότι προσβάλλει τα κουνέλια προκαλώντας τους κονδυλώματα που μοιάζουν με «κέρατα» (Shope and Hurst, 1933).

Η ανάλυση των ανθρώπινων θηλωμάτων και η σχέση τους με τις ιικές λοιμώξεις και την καρκινογένεση πραγματοποιήθηκε αρκετές δεκαετίες αργότερα, διότι τα κονδυλώματα θεωρούνταν για χρόνια (ως) μία απλή κοσμητική ενόχληση και δεν παρουσίαζαν κανένα ιατρικό ενδιαφέρον. Μια σταδιακή αλλαγή οπτικής προήλθε από την Stefania Jablonska, η οποία κατέδειξε την πιθανή συμμετοχή των Papilloma ιών ως τους αιτιολογικούς παράγοντες της δημιουργίας των καρκινικών εξαλλαγών του δέρματος. Αναλυτικότερα, η Jablonska παρατήρησε ότι οι ασθενείς που εμφάνιζαν κονδυλώματα σε σημεία τα οποία εκτίθονταν στην ηλιακή ακτινοβολία, μετέπειτα μετατρέπονταν σε όγκους του πλακώδους επιθηλίου (Jablonska et al., 1972).

Λίγα χρόνια αργότερα, το 1976, ο Γερμανός ιολόγος Harald zur Hausen πρότεινε ότι η κύρια αιτία καρκίνου του τραχήλου της μήτρας ήταν οι ιοί των Ανθρώπινων Θηλωμάτων (Human Papillomaviruses, HPVs). Ακολούθησε η απομόνωση των πρώτων στελεχών HPV-16 και HPV-18 από καρκινικούς όγκους του τραχήλου της μήτρας (Boshart et al., 1984, Gissman et al., 1984). Για την συνδρομή του στην έρευνα των HPVs, ο zur Hausen τιμήθηκε με το βραβείο Νόμπελ Ιατρικής το 2008. Έκτοτε, ανιχνεύτηκαν αρκετοί τύποι HPVs, οι οποίοι σχετίζονται με διάφορους τύπους καρκίνων. Σήμερα, ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας αποτελεί την τρίτη πιο συχνή ένδειξη κακοήθειας στον γυναικείο πληθυσμό (Jemal, 2011).

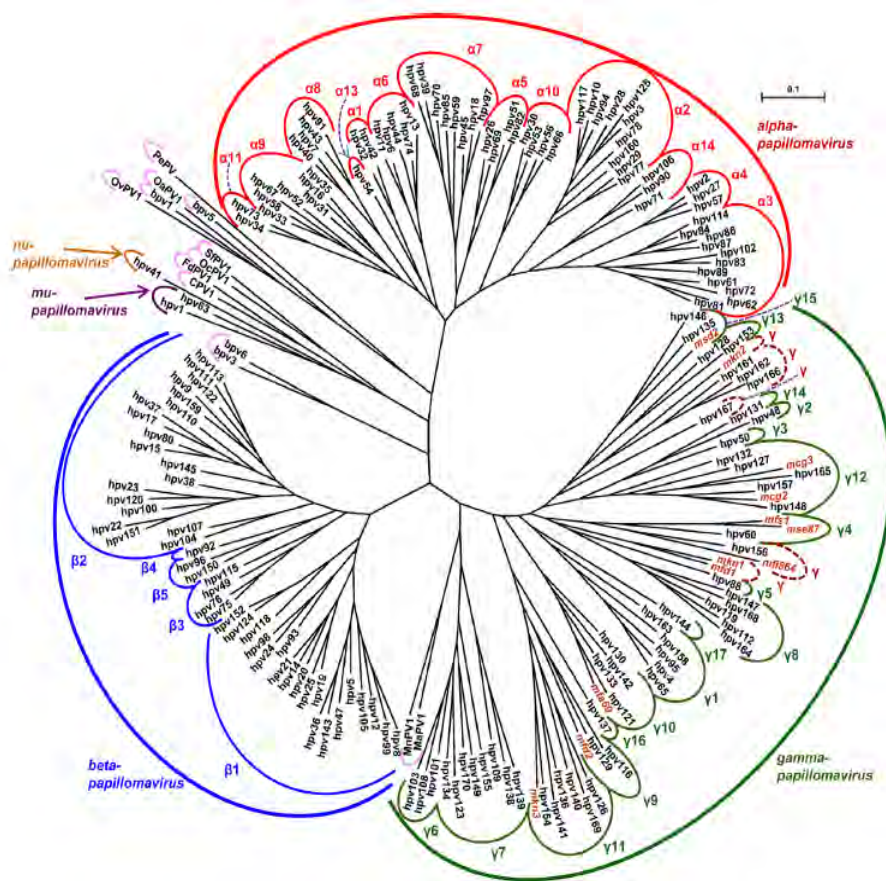
## **2. Ταξινόμηση των Papilloma ιών**

Οι Papilloma ιοί συγκροτούν μια αρκετά ετερογενή ομάδα ιών, οι οποίοι προσβάλλουν τα περισσότερα θηλαστικά και τα πτηνά. Αρχικά είχαν ομαδοποιηθεί μαζί με τους Polyoma ιούς, συγκροτώντας την υπερικογένεια των Papovaviridae. Η ταξινόμηση αυτή βασίστηκε στο γεγονός ότι διαθέτουν όμοια, άνευ περιβλήματος καψίδια και παρόμοια γονιδιώματα (κυκλικό, δίκλωνο DNA). Στη συνέχεια αναγνωρίστηκε ότι οι δύο ανωτέρω ομάδες ιών έχουν διαφορετικά μεγέθη γονιδιώματος, παρουσιάζουν εντελώς διαφορετική οργάνωση των γονιδιωμάτων τους καθώς και ότι δεν διαθέτουν καμία

ουσιαστική νουκλεοτιδική και αμινοξική ομολογία. Συνεπώς, το 2002 η Διεθνής Επιτροπή Ταξινόμησης των Ιών (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV) διαχώρισε την υπερικογένεια των Paponaviridae σε δύο ξεχωριστές οικογένειες: σε αυτή των Papillomaviridae και αυτή των Polyomaviridae (Van Regenmortel et al., 2002, de Villiers et al., 2004).

Παραδοσιακά, οι Papilloma ιοί διακρίνονται σε «τύπους». Αν και οι πρώτοι τύποι PVs απομονώθηκαν 40 χρόνια πριν (Orth et al., 1977), η δυσκολία να βρεθεί η κατάλληλη κυτταρική σειρά διαφοροποιούμενων επιθηλιακών κυττάρων ώστε να καλλιεργηθούν οι Papilloma ιοί, περιόριζε για χρόνια την εγκαθίδρυση ενός ταξινομικού συστήματος βασισμένο σε βιολογικά χαρακτηριστικά. Για τον λόγο αυτό, η ομαδοποίησή τους βασίστηκε εξ ολοκλήρου στον προσδιορισμού του γενοτύπου και όχι του οροτύπου του ιού. Αναλυτικότερα, οι Papilloma ιοί ταξινομούνται με βάση την νουκλεοτιδική αλληλουχία του γονιδίου L1, το οποίο αποτελεί το πιο συντηρημένο γονίδιο. Ένας νέος τύπος PV ορίζεται εφόσον η νουκλεοτιδική αλληλουχία του γονιδίου L1 διαφέρει περισσότερο από 10% από τον πιο συγγενικά γνωστό τύπο PV. Διαφορές μεταξύ 2% - 10% ορίζουν έναν υπότυπο, ενώ διαφορές μικρότερες από 2% ορίζουν μια παραλλαγή (de Villiers et al., 2004, Bernard et al., 2010).

Οι ιοί των Θηλωμάτων διακρίνονται σε δεκαέξι γένη, τα ονόματα των οποίων προέρχονται από ένα γράμμα του ελληνικού αλφαβήτου, από το γράμμα Άλφα (α) έως το γράμμα Πι (π), σύμφωνα με την πιο πρόσφατη εξελικτική θεώρηση (de Villiers, 2013). Κάθε γένος διαχωρίζεται περαιτέρω σε τύπους, υπότυπους και παραλλαγές, όπως ήδη αναφέρθηκε, με βάση τη νουκλεοτιδική ομοιότητα του καψιδιακού γονιδίου L1 (Εικόνα 1).



**Εικόνα 1:** Φυλογενετικό δέντρο 170 HPVs και κάποιων PVs που προσβάλλουν τα ζώα (de Villiers, 2013).

Όσον αφορά τους ιούς των Ανθρώπινων Θηλωμάτων (HPVs), διακρίνονται σε πέντε γένη: Άλφα-, Βήτα-, Γάμμα-, Μι- και Νι-PVs. Η ομαδοποίησή τους πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το βαθμό ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης που προκαλούν, τα διαφορετικά χαρακτηριστικά του κύκλου ζωής τους, καθώς και την ανάλυση του γονιδιώματός τους (de Villiers et al., 2004, Bernard et al., 2010).

Οι HPVs παρουσιάζουν τυπο-ειδικό επιθηλιακό τροπισμό προκαλώντας μια ευρεία ποικιλία συμπτωμάτων που κυμαίνονται από κονδυλώματα ως δυσπλασίες και καρκίνο (Doorbar et al., 2012). Ταξινομούνται σε ομάδες υψηλού κινδύνου (High Risk), ενδιάμεσου (Middle Risk) και χαμηλού κινδύνου (Low Risk), με βάση το κακοήθες δυναμικό τους (Πίνακας 1). Σύμφωνα με την Παγκόσμια Αρχή της Έρευνας στον Καρκίνο (International Agency for Research on Cancer, IARC) της Παγκόσμιας Οργάνωσης Υγείας, οι τύποι HPV υψηλού κινδύνου συνδέονται με πάνω από το 90% των περιπτώσεων των καρκινικών αλλοιώσεων του τραχήλου της μήτρας. Κυριότερος εκπρόσωπος της κατηγορίας αυτής είναι ο HPV-16, ο

οποίος είναι ο πιο συχνά ανιχνεύσιμος τύπος σε κάθε βαθμό ενδοεπιθηλιακής δυσπλασίας (Bzhalava et al., 2013).

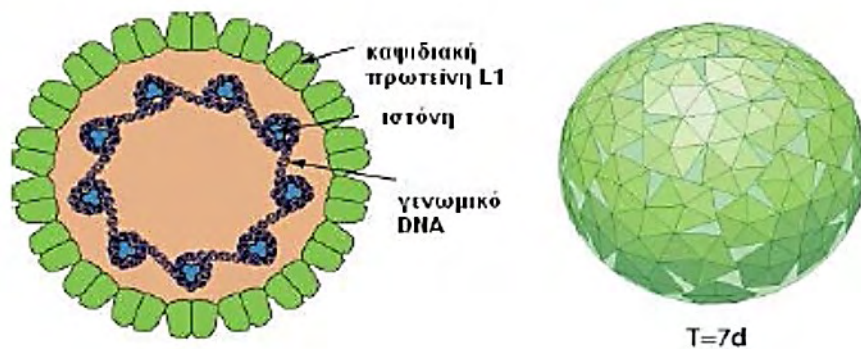
Ομάδες Επικινδυνότητας	Τύποι HPV
<b>Υψηλού κινδύνου (High Risk)</b>	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 55, 56, 58, 59, 68, 73, 82, 83
<b>Ενδιάμεσου κινδύνου (Middle Risk)</b>	26, 53, 66
<b>Χαμηλού κινδύνου (Low Risk)</b>	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81

**Πίνακας 1:** Ταξινόμηση των HPVs σε ομάδες επικινδυνότητας (Bzhalava et al., 2013) και IARC.

### 3. Δομή των Human Papillomaviruses (HPVs)

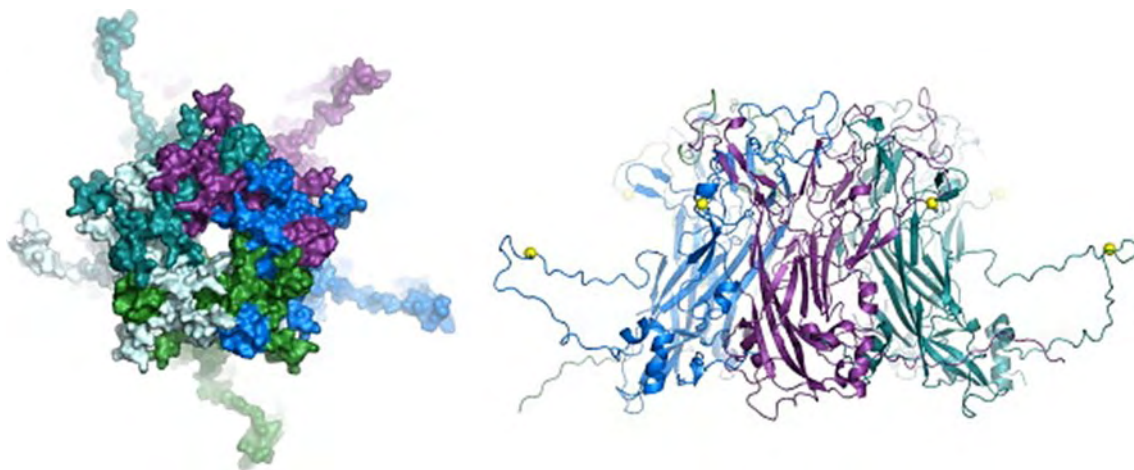
#### 3.1. Δομή του καψιδίου

Τα ιικά σωματίδια των HPVs έχουν διάμετρο της τάξης των 55-60 nm και εσωκλείουν το γονιδίωμά τους σε ένα εικοσαεδρικό πρωτεϊνικό καψίδιο. Οι δύο πρωτεΐνες που είναι υπεύθυνες για το σχηματισμό του καψιδίου παράγονται από τα γονίδια L1 και L2, τα οποία εκφράζονται κατά την όψιμη φάση του κύκλου μόλυνσης του ιού (Doorbar et al., 2012). Η εξωτερική επιφάνεια του καψιδίου σχηματίζεται από την πρωτεΐνη L1, ενώ εσωτερικά του σκελετού της L1, τοποθετείται η πρωτεΐνη L2. Από την ανάλυση της κρυσταλλικής δομής του ιού βρέθηκε ότι η εξωτερική επιφάνεια των ιοσωματίων των HPVs αποτελείται από 72 πενταμερή της καψιδιακής πρωτεΐνης L1 και σχηματίζει T=7 εικοσαεδρικά καψίδια (Εικόνα 2) (Baker et al., 1991).



**Εικόνα 2:** Δομή του καψιδίου των HPVs.

Η μείζονα καψιδιακή πρωτεΐνη L1, μοριακού βάρους 55 kDa, διαθέτει την ικανότητα αυτό-συναρμολόγησης σε ιικά σωματίδια και μεσολαβεί στην αρχική αλληλεπίδραση του ιού με τον ξενιστή. Αμέσως μετά την κυτταρική προσκόλληση, η L1 γίνεται αρκετά εύπλαστη, ώστε να επιτρέψει την απελευθέρωση του ιικού γονιδιώματος στο εσωτερικό του κυττάρου-ξενιστή. Η εξωτερική επιφάνεια του καψιδίου των HPVs είναι οζώδης και φέρει 72 πλαϊνές προεξοχές, οι οποίες σχηματίζονται από πενταμερή της L1 πρωτεΐνης. Μεταξύ των γειτονικών πενταμερών δημιουργείται ένας δισουλφιδικός δεσμός που προσδίδει σταθερότητα στο καψίδιο (Buck et al., 2013).



**Εικόνα 3:** Δομή ενός L1 πενταμερούς.

Η ελάσσονα καψιδιακή πρωτεΐνη L2, μοριακού βάρους 55 kDa, παίζει βασικό ρόλο στη συναρμολόγηση του ιού καθώς και στη μόλυνση του κυττάρου-ξενιστή. Αν και η L2 δεν διαθέτει την ικανότητα αυτο-συγκρότησης της L1, ωστόσο συμβάλλει καθοριστικά στη συναρμολόγηση του καψιδίου ενισχύοντας την αλληλεπίδραση του ιού με τον ξενιστή του. Μελέτες έχουν δείξει ότι η πρωτεΐνη L2 συνδέεται με την L1 μέσω μιας υδρόφοβης περιοχής κοντά στο C-τελικό άκρο της. Το αποτέλεσμα αυτής της σύνδεσης είναι να εισέλθει η L2 στο κέντρο του L1 πενταμερούς (Finnen et al., 2003). Βασική της λειτουργία είναι η συμβολή της μαζί με την ιική πρωτεΐνη E2 στο πακετάρισμα των ώριμων ιικών σωματιδίων. Εμπλέκεται επίσης στη διαδικασία καταστροφής των ενδοσωμικών κυστιδίων συντελώντας στην απελευθέρωση των ιοσωματίων εντός του κυττάρου (Wang and Roden, 2013).

### **3.2. Οργάνωση του γονιδιώματος**

Οι HPVs διαθέτουν ένα δίκλωνο, κυκλικό μόριο DNA, μήκους περίπου 8.000 bp. Η οργάνωση του γονιδιώματος είναι αρκετά συντηρημένη μεταξύ των διαφορετικών τύπων HPV. Ειδικότερα, το γονιδίωμα του HPV-16 διακρίνεται σε τρεις κύριες περιοχές: την πρόωμη (early, E), την όψιμη (late, L) και την ρυθμιστική περιοχή (long control region, LCR) (Εικόνα 4.).







περιοχή LCR, μήκους 850bp, δεν κωδικοποιεί καμία πρωτεΐνη. Ωστόσο, η περιοχή αυτή περιέχει την θέση έναρξης της αντιγραφής καθώς και θέσεις πρόσδεσης σημαντικών μεταγραφικών παραγόντων (π.χ. SP1, AP1, Oct1) (Bernard, 2013).

## 4. Πρώιμες ιικές πρωτεΐνες

### 4.1. Πρωτεΐνη E1

Η πρωτεΐνη E1 είναι μια εξαμερής ATP-εξαρτώμενη DNA ελικάση και αποτελεί το μοναδικό ένζυμο που κωδικοποιείται από τους Papilloma ιούς. Ο ρόλος αυτής της υψηλά συντηρημένης πρωτεΐνης είναι κρίσιμος για την αντιγραφή του ιικού επισώματος στον πυρήνα των μολυσμένων κερατινοκυττάρων. Θεωρείται απαραίτητη κατά τον κύκλο αντιγραφής του ιού, αρχικά για την αύξηση του αριθμού των αντιγράφων των ιικών επισωμάτων στα κερατινοκύτταρα της βασικής στιβάδας, έπειτα για τη διατήρηση σταθερού επιπέδου επισωμάτων στα κύτταρα που μεταφέρονται ανοδικά στο επιθήλιο και αρχίζουν να διαφοροποιούνται και, τέλος, για την ενίσχυση του ιικού γενώματος κατά την παραγωγική φάση του ιού στις πλέον διαφοροποιημένες επιθηλιακές στιβάδες (Bergvall et al., 2013). Πιο συγκεκριμένα, παρουσία ATP, η E1 αναγνωρίζει συγκεκριμένη αλληλουχία του ιού, τη θέση έναρξης της αντιγραφής (origin of replication, ori), η οποία εντοπίζεται ανοδικά των πρώιμων γονιδίων. Στη συνέχεια, με την βοήθεια της πρωτεΐνης E2, συγκροτεί ένα διπλό εξαμερές με δραστικότητα ελικάσης ικανό να ξετυλίξει το DNA στην περιοχή «ori» και να δημιουργήσει την αντιγραφική διχάλα (Lu et al., 1993, Lee et al., 1997, Bergvall et al., 2013).

Η E1 κωδικοποιείται από το μεγαλύτερο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης στο γονιδίωμα των PVs και το μέγεθος της πρωτεΐνης κυμαίνεται μεταξύ 600 και 650 αμινοξέων, ανάλογα με τον τύπο του PV (Bergvall et al., 2013). Όσον αφορά στη δομή της, η E1 μπορεί να διαιρεθεί σε τρία λειτουργικά τμήματα: τη N-τελική ρυθμιστική περιοχή, η οποία είναι απαραίτητη για την βέλτιστη αντιγραφή του ιού (Amin et al., 2000, Morin et al., 2011), την κεντρική

περιοχή που προσδένεται στο DNA (DNA-binding domain, DBD), η οποία αναγνωρίζει συγκεκριμένες θέσεις στην περιοχή έναρξης της αντιγραφής (Sun et al., 1998, Titolo et al., 2003, Auster and Joshua-Tor, 2004) και τη C-τελική ενζυματική περιοχή, ικανή να αυτοσυγκροτείται σε εξαμερή με δραστικότητα ATPάσης τα οποία έχουν, επιπλέον, τη δυνατότητα να ξετυλίγουν μικρά δίκλωνα DNA (εικόνα 5) (Titolo et al., 2000, White et al., 2001, Castella et al., 2006).



**Εικόνα 5:** Σχηματική αναπαράσταση της πρωτεΐνης E1 του BPV1, όπου επισημαίνονται τα κύρια λειτουργικά της τμήματα (Bergvall et al., 2013).

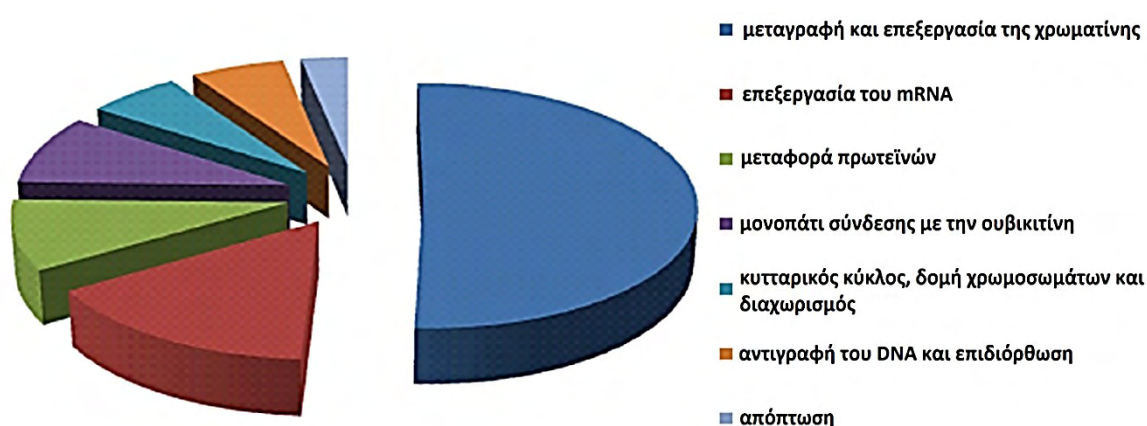
## 4.2. Πρωτεΐνη E2

Η πρωτεΐνη E2 των Papilloma ιών παίζει κεντρικό ρόλο στον κύκλο ζωής τους και διαθέτει καλά χαρακτηρισμένη λειτουργία στη ρύθμιση της μεταγραφής, στην έναρξη της αντιγραφής του DNA, σε μετα- μεταγραφικές τροποποιήσεις αλλά πιθανώς και στο πακετάρισμα του ιού. Η απαραίτητη αυτή ρυθμιστική πρωτεΐνη κωδικοποιείται από όλους τους Papilloma ιούς. Προσδένεται σε ειδικές θέσεις μήκους 12bp στο ιικό γονιδίωμα, οι οποίες βρίσκονται εντός της ρυθμιστικής περιοχής LCR και η έκφρασή της λαμβάνει χώρα στα πρώιμα και τα ενδιάμεσα στάδια του κύκλου ζωής του ιού (McBride, 2013).

Δομικά, η E2 διαιρείται σε δύο κύρια λειτουργικά τμήματα: μία συντηρημένη N-τελική περιοχή διενεργοποίησης (transactivation domain, TAD), η οποία εμπλέκεται στην ρύθμιση της μεταγραφής των ιικών γονιδίων και στην αλληλεπίδραση με την πρωτεΐνη E1, και μία C-τελική περιοχή, υπεύθυνη για την πρόσδεση της E2 στο ιικό DNA και τον διμερισμό της E1

(DNA binding/dimerization domain, DBD). Μεταξύ αυτών των δύο περιοχών παρεμβάλλεται μια εύκαμπτη αλληλουχία σύνδεσης, που ονομάζεται «αρμός» (hinge), η οποία ποικίλλει σε μέγεθος και νουκλεοτιδική σύσταση μεταξύ των διαφορετικών γενών των PVs (Giri and Yanin, 1988, McBride et al., 1988, 2013).

Μια από τις βασικές λειτουργίες της πρωτεΐνης E2 είναι η ρύθμιση της μεταγραφής των Papilloma ιών (Lambert et al., 1987, Chin et al., 1988, Choe et al., 1989). Αρχικά δρα στρατολογώντας κυτταρικούς παράγοντες στο ικό γένωμα οι οποίοι ενεργοποιούν ή καταστέλλουν τις διαδικασίες της ρύθμισης. Στις ειδικές θέσεις που προσδένεται στο ικό γένωμα, είτε ενεργοποιεί είτε καταστέλλει τη μεταγραφή, ανάλογα με την φύση των σχετιζόμενων κυτταρικών παραγόντων (Bernard et al., 1989, Stubenrauch et al., 1996). Μια ακόμη βασική λειτουργία της σημειώνεται κατά την έναρξη της αντιγραφής του ιικού γενώματος όπου η πρωτεΐνη E2 μεταφέρει την E1 ελικάση στη θέση έναρξης της αντιγραφής (Mohr et al., 1990; Sanders and Stenlund, 2000). Άλλες σημαντικές διαδικασίες στις οποίες φαίνεται να συμμετέχει είναι: στην κατανομή του επισωμικού γονιδιώματος του ιού στα θυγατρικά κύτταρα στην φάση της μίτωσης (McBride et al., 2008), στο πακετάρισμα του ιικού DNA όπου φαίνεται να αυξάνει την διαδικασία (Zhao et al., 2000, Day et al., 2004), αλλά πιθανώς και στη ρύθμιση της επεξεργασίας των ιικών μεταγράφων (Johansson et al., 2012). Όπως φαίνεται στην εικόνα 6, η πρωτεΐνη παρουσιάζει μια πληθώρα λειτουργιών .



**Εικόνα 6:** Κατηγορίες των λειτουργιών στις οποίες εμπλέκεται η πρωτεΐνη E2 (McBride, 2013).

### 4.3. Πρωτεΐνη E4

Το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης του γονιδίου E4 εμπεριέχεται στο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης του γονιδίου E2 των Papilloma ιών και ποικίλλει σημαντικά σε μέγεθος μεταξύ των διαφόρων τύπων PVs. Το βασικό προϊόν του γονιδίου E4 εκφράζεται από ένα ματισμένο μόριο mRNA ( $E1^+E4$ ), του οποίου το εναρκτήριο αμινοξύ καθώς και τα πέντε πρώτα αμινοξικά κατάλοιπα προέρχονται από το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης του γονιδίου E1. Κατά τη διάρκεια του κύκλου ζωής του ιού, η πρωτεΐνη  $E1^+E4$  ανιχνεύεται κυρίως στα όψιμα στάδια της μόλυνσης και παράγεται σε μεγαλύτερες ποσότητες από όλες τις πρωτεΐνες του ιού (Doorbar et al., 2013).

Η πρωτεΐνη E4 του HPV-16 έχει μήκος 92 αμινοξέα και διακρίνεται σε τρεις κύριες λειτουργικές περιοχές: στο N-τελικό άκρο όπου συναντάται το συντηρημένο μοτίβο LLKLL, το οποίο είναι απαραίτητο για την αλληλεπίδραση με το δίκτυο ινιδίων κερατίνης, σε μια ενδιάμεση περιοχή, η οποία είναι πλούσια σε προλίνη και σχετίζεται με την διακοπή του κυτταρικού κύκλου στην φάση G2, και στην C-τελική περιοχή, η οποία είναι υπεύθυνη για την καταστροφή και αναδιοργάνωση του δικτύου κερατίνης (Roberts et al., 1997).

Η βασική λειτουργία της πρωτεΐνης E4 είναι η συμβολή της στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού των διαφοροποιημένων κερατινοκυττάρων. Πρόσφατα, προτάθηκε ότι η E4 πιθανόν να εμπλέκεται και στην διαδικασία απελευθέρωσης των νεοσχηματιζόμενων ιικών σωματιδίων (McIntosh et al., 2010) καθώς και στην παύση του κυτταρικού κύκλου στην φάση G2 (Davy et al., 2002).

### 4.4. Πρωτεΐνη E5

Πολλοί papilloma ιοί (μα όχι όλοι) κωδικοποιούν την πρωτεΐνη E5, μια μικρή διαμεμβρανική πρωτεΐνη μήκους 40 – 85 αμινοξέων με ικανότητες μετασχηματισμού, ο ρόλος της οποίας είναι ελάχιστα καθορισμένος κατά την παραγωγική μόλυνση. Οι Άλφα HPV τύποι υψηλού κινδύνου μεταξύ των οποίων και ο HPV16 κωδικοποιούν μια συντηρημένη E5 πρωτεΐνη μεγέθους περίπου 80 αμινοξέων (Bravo and Allonso, 2004, Di Mao and Petti, 2013) Η

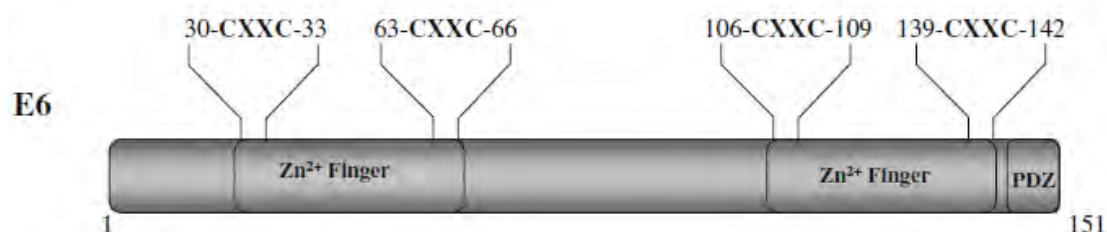
πρωτεΐνη E5 των HPVs εκφράζεται από ένα ματισμένο μόριο mRNA, το οποίο ξεκινά να μεταγράφεται ανοδικά του γονιδίου E2. Είναι πλούσια σε υδρόφοβα αμινοξέα, τα οποία συγκεντρώνονται σε μία ή περισσότερες διαμεμβρανικές περιοχές, δίνοντας στην E5 τη δυνατότητα να αλληλεπιδρά με έναν μεγάλο αριθμό κυτταρικών πρωτεϊνών (DiMaio and Petti, 2013). Εντοπίζεται στις μεμβράνες των ενδοσωμάτων, στη συσκευή Golgi και περιστασιακά στις κυτταρικές μεμβράνες (Conrad, M, et al. 1993). Έχει παρατηρηθεί ότι η πρωτεΐνη E5 ενισχύει την ικανότητα των ογκογονιδίων E6 και E7 να προκαλούν αθανатоποίηση των πρώιμων ανθρώπινων κερατινοκυττάρων (Stoppler et al., 1996) και να αυξάνουν την κινητικότητα και την ικανότητα διήθησης των πρώιμων ανθρώπινων κερατινοκυττάρων. Συγκεκριμένα, στον ιό HPV 16 έχει βρεθεί ότι η E5 δρα συνεργατικά με τον επιδερμικό αυξητικό παράγοντα (epidermal growth factor, EGF) επάγοντας τη μιτογόνο δράση των πρώιμων ανθρώπινων κερατινοκυττάρων και αυξάνοντας την ικανότητα διήθησής τους (Kivi et al., 2008, Barbaresi et al., 2010, DiMaio and Petti, 2013). Επιπλέον έχει φανεί ότι η πρωτεΐνη E5 του HPV16 αυξάνει τα επίπεδα του υποδοχέα του EGF (EGFR) στην επιφάνεια των κυττάρων ευαισθητοποιώντας τα κύτταρα στον EGF (Straight et al., 1993).

Μια ακόμη δράση της πρωτεΐνης E5 είναι η ικανότητά της να μειώνει την έκφραση των αναστολέων των κυκλινο-εξαρτώμενων πρωτεϊνικών κινασών (cyclin-dependent protein kinase inhibitors, CKIs) p21 και p27, προκαλώντας την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου στη φάση S και τη σύνθεση του DNA (Venuti et al., 2011). Τέλος, η ιική πρωτεΐνη E5 εμπλέκεται και στην ικανότητα του ιού να αποφεύγει την ανοσολογική απάντηση, αλληλεπιδρώντας με την βαριά αλυσίδα του ανθρώπινου MHC τύπου I και οδηγώντας έτσι στη μείωση των επιπέδων έκφρασης κυτταρικών πρωτεϊνών εμπλεκόμενων στην αντιγονοπαρουσίαση (Ashrafi et al., 2005, DiMaio and Petti, 2013).

#### 4.5. Πρωτεΐνη E6

Φυλογενετικές αναλύσεις των γονιδιωμάτων των Papilloma ιών σε σύγκριση με το είδος του ξενιστή τους, έχουν δείξει ότι οι ιοί αυτοί έχουν εξελιχθεί μαζί με τους ξενιστές τους (Bernard, 1994; Chan et al., 1992; Tachezy et al., 2002). Σε σχέση με άλλες γενωμικές περιοχές, οι περιοχές E6 - E7 παρουσιάζουν αυξημένη ποικιλομορφία στους Papilloma ιούς (Garcia-Vallve et al., 2005). Μάλιστα, αρκετοί Papilloma ιοί δεν διαθέτουν καθόλου γονίδιο E6 (BPV τύποι 3, 4, 6, και HPV τύποι 101 και 103) (Chen et al., 2007; de Villiers et al., 2004; Tachezy et al., 2002; Terai et al., 2002).

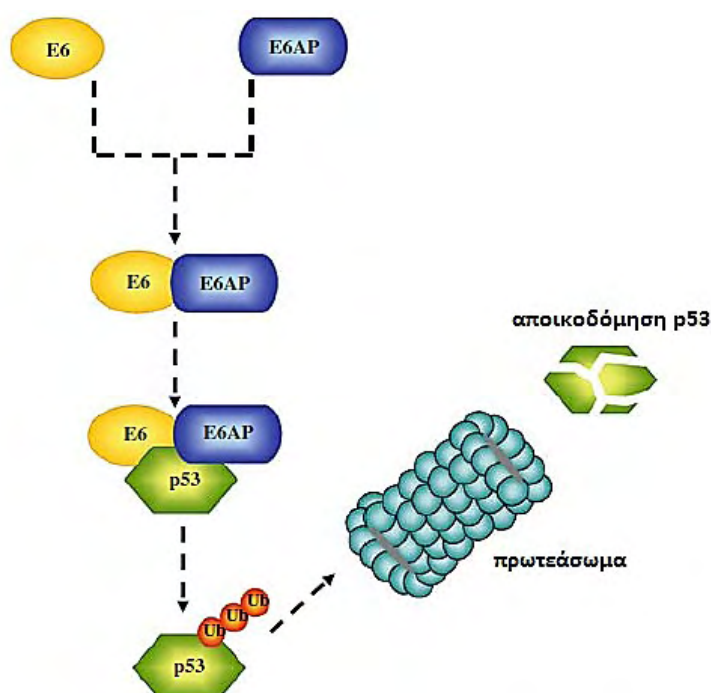
Η πρωτεΐνη E6 αποτελεί μία πρόιμη ική ογκοπρωτεΐνη, η οποία συμβάλλει στην αθανатоποίηση και τον μετασχηματισμό των επιθηλιακών κυττάρων που έχουν μολυνθεί από HPV υψηλού κινδύνου. Είναι μία από τις πρώτες πρωτεΐνες που εκφράζονται κατά την διάρκεια της HPV λοίμωξης (Kajitani, 2012). Στον ιό HPV 16, η πρωτεΐνη E6 αποτελείται από 151 αμινοξέα. Το κύριο δομικό χαρακτηριστικό της είναι η παρουσία δύο δακτύλων ψευδαργύρου στη βάση των οποίων εντοπίζεται το μοτίβο Cys-X-X-Cys το οποίο είναι συντηρημένο στις πρωτεΐνες E6 όλων των τύπων HPV (εικόνα 7) (Ghittoni et al., 2010).



**Εικόνα 7:** Σχηματική αναπαράσταση της πρωτεΐνης E6. Διακρίνονται τα τέσσερα μοτίβα Cys-X-X-Cys καθώς και ένα μοτίβο PDZ (PSD-95/Dlg/ZO1) στο C-τελικό άκρο.

Η πιο σημαντική λειτουργία της E6 πρωτεΐνης είναι η αλληλεπίδραση της με την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53. Η πρωτεΐνη p53 ρυθμίζει την έκφραση πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Μια από αυτές τις πρωτεΐνες είναι ο αναστολέας της κινάσης της κυκλίνης p21. Όταν το κύτταρο βρεθεί σε συνθήκες στρες, όπως βλάβη στο DNA, η p53

επάγει την έκφραση της p21, η οποία με την σειρά της αναστέλλει τον κυτταρικό κύκλο με σκοπό την επιδιόρθωση της βλάβης αυτής. Εάν η βλάβη δεν επιδιορθωθεί τότε η p53 οδηγεί το κύτταρο σε απόπτωση (Artandi et al., 2005). Μελέτες έχουν δείξει ότι η E6 προσδένεται στην ουβικιτινική λιγάση E6AP και, στη συνέχεια, το σύμπλοκο E6/E6AP προσδένεται στην p53, η οποία άμεσα ουβικιτινιλώνεται και οδηγείται στο 26S πρωτεάσωμα για την αποικοδόμησή της (εικόνα 8) (Huibregtse et al., 1991, Scheffner et al., 1993, Zanier et al., 2012, Vande Pol and Klingelutz, 2013)



**Εικόνα 8:** Η πρωτεΐνη E6 του HPV 16 στοχεύει την p53 για αποικοδόμηση μέσω του μονοπατιού ουβικιτίνης/πρωτεασώματος. Η πρωτεΐνη E6 αλληλεπιδρά με την ουβικιτινική λιγάση E6AP, το διμερές σύμπλοκο, στη συνέχεια, στρατολογεί την p53 και τελικά την οδηγεί στο πρωτεάσωμα για αποικοδόμηση (Ghittoni et al., 2010).

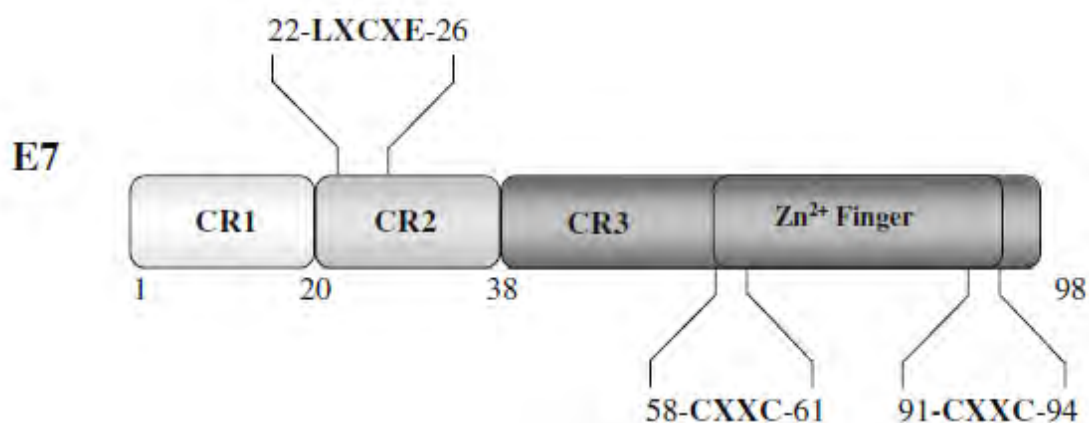
Εκτός από την αλληλεπίδραση της με την p53, μια ακόμη βασική ικανότητα της πρωτεΐνης E6 των HPV υψηλού κινδύνου της βλεννογόνου και κάποιων δερματικών, είναι η ενεργοποίηση του ενζυμικού συμπλόκου της τελομεράσης. Το σύμπλοκο αυτό δρα προσθέτοντας αντίγραφα τελομερών στα άκρα των χρωμοσωμάτων. Πιο συγκεκριμένα, η E6 ενεργοποιεί τη

μεταγραφή του γονιδίου της hTERT (human Telomerase Reverse Transcriptase) από το οποίο παράγεται η καταλυτική υπομονάδα του ενζυμικού αυτού συμπλόκου (Klingelhutz et al., 1996). Τα κύτταρα που έχουν μολυνθεί από τον HPV 16 παρουσιάζουν ιδιαίτερα αυξημένα επίπεδα ενεργότητας της τελομεράσης, επιτρέποντας έτσι τη διατήρηση του μήκους των τελομερών και τον απεριόριστο πολλαπλασιασμό (Ghittoni et al., 2010, Gewin et al., 2004)

#### 4.6. Πρωτεΐνη E7

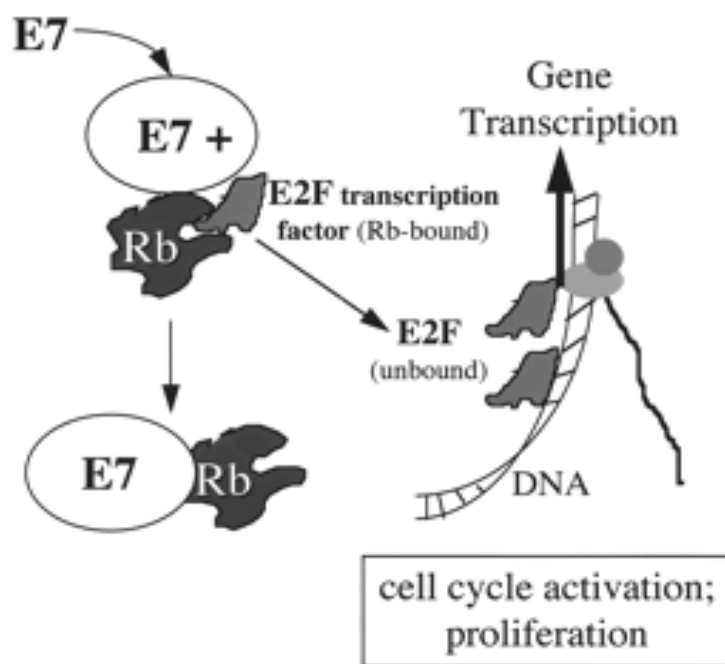
Η πρωτεΐνη E7 κατέχει κεντρικό ρόλο στον κύκλο ζωής των Papilloma ιών, επαναπρογραμματίζοντας το κυτταρικό περιβάλλον ώστε να ευνοείται η αντιγραφή του ιού. Η πρωτεΐνη E7 που κωδικοποιείται από τους σχετιζόμενους με καρκίνο alpha HPVs, μαζί με την E6, έχει ικανότητες μετασχηματισμού απαραίτητες αλλά μη επαρκείς να καταστήσει τα επιθηλιακά κύτταρα του ξενιστή σε ογκογόνα (Roman and Munger, 2013). Αποτελείται από περίπου 100 αμινοξέα και περιέχει τρεις συντηρημένες περιοχές (conserved regions, CR), την N-τελική CR1 περιοχή, την CR2 και την C-τελική CR3 περιοχή. Η περιοχή CR1 είναι απαραίτητη για τον κυτταρικό μετασχηματισμό και την αποικοδόμηση της pRb, η CR2 περιέχει την αμινοξική αλληλουχία LXCXE, η οποία εμπλέκεται στην πρόσδεση με την πρωτεΐνη pRb, ενώ η CR3 περιέχει δύο μοτίβα δακτύλων ψευδαργύρου και συμβάλλει στη σύνδεση της E7 με την pRb και με άλλες κυτταρικές πρωτεΐνες (εικόνα 9) (Munger et al., 2004, Hebner and Laimins, 2006, Boulet et al., 2007).





**Εικόνα 9:** Σχηματική αναπαράσταση της πρωτεΐνης E7. Διακρίνονται οι τρεις συντηρημένες περιοχές CR1, CR2 και CR3. Στην CR2 φαίνεται το μοτίβο LXCXE και στην CR3 οι δάκτυλοι ψευδαργύρου με τα μοτίβα Cys-X-X-Cys (Ghittoni et al., 2010).

Ίσως η βασικότερη λειτουργία της πρωτεΐνης E7 των ιών HPV υψηλού κινδύνου, είναι η δυνατότητά της να αλληλεπιδρά με την οικογένεια των πρωτεϊνών του ρετινοβλαστώματος (pRb, p103, p107). Στα φυσιολογικά κύτταρα, απουσία μιτογόνου σήματος, η pRb βρίσκεται στην αποφωσφορυλιωμένη μορφή της και δημιουργεί σύμπλοκα με τον μεταγραφικό ενεργοποιητή E2F. Μετά την σύνδεση της E7 με την pRb, η δεύτερη φωσφορυλιώνεται με αποτέλεσμα ο μεταγραφικός παράγοντας E2F να καθίσταται ενεργός και να διεγείρει την μεταγραφή μιας ομάδας γονιδίων που σχετίζονται με την προώθηση του κυτταρικού κύκλου στην φάση S (εικόνα 10) (Ghittoni et al., 2010). Εκτός από την pRb, η ογκοπρωτεΐνη E7 αλληλεπιδρά και με τις πρωτεΐνες p103 και p107, οι οποίες αποτελούν αρνητικούς ρυθμιστές του παράγοντα E2F (Boulet et al., 2007, Roman and Munger, 2013). Αποτέλεσμα όλων των ανωτέρω δράσεων της E7 είναι η απορρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και συνεπώς ο ανεξέλεγκτος κυτταρικός πολλαπλασιασμός.



**Εικόνα 10:** Η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη pRb αλληλεπιδρά με τον E2F ώστε να κατασταλεί η μεταγραφή γονιδίων απαιτούμενων για τη φάση S του κυτταρικού κύκλου. Αλληλεπιδρώντας η pRb με την E7, η E2F καθίσταται ενεργή (M. El Mzibri et al., 2012)

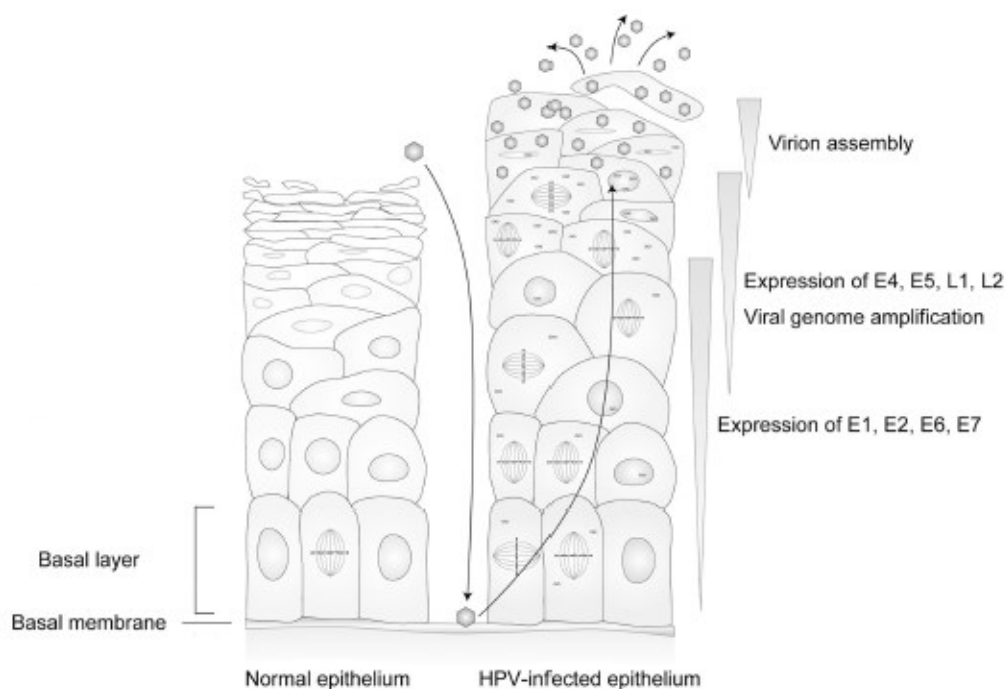
Εκτός από τις πρωτεΐνες του ρετινοβλαστώματος, η ιική πρωτεΐνη E7 διεγείρει τα γονίδια στη φάση S του κυτταρικού κύκλου, κυκλίνη E και A. Ακόμη καταργεί την ανασταλτική ιδιότητα των p21 και p27, οι οποίοι είναι αναστολείς κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών (CKIs). Αυτές οι αλληλεπιδράσεις αποτελούν μείζον πρόβλημα όσων αφορά στη διέγερση της ανάπτυξης των μολυσμένων από τον ιό κυττάρων (Zur Hausen, 2000).

Μια τρίτη ομάδα πρωτεϊνών με τις οποίες συνδέεται η E7 είναι οι απακετυλάσες των ιστονών (HDACs). Οι HDACs εκφράζονται σε όλους τους ιστούς και βασική τους λειτουργία είναι η μετακίνηση των ακετυλομάδων από τις ιστόνες. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η pRb δημιουργεί σύμπλοκο με τις HDACs και τις στρατολογεί στους υποκινητές των E2F γονιδίων. Με τον τρόπο αυτό, καταστέλλεται η μεταγραφή του παράγοντα E2F και αναστέλλεται η λειτουργία του. Μετά από μόλυνση από ιό HPV, η E7 συνδέεται στις HDACs, παρεμποδίζοντας την σύνδεσή τους με την pRb, με αποτέλεσμα να μεταγράφεται ο E2F και να διεγείρει την προώθηση του κυτταρικού κύκλου, απουσία μιτογόνου σήματος (Longworth, 2005).

## 5. Κύκλος ζωής του ιού

### 5.1. Είσοδος στο κύτταρο του ξενιστή

Οι Papilloma ιοί του ανθρώπου στοχεύουν τα κύτταρα του πολύστιβου επιθηλίου του δέρματος. Τα ιοσωμάτια εισβάλλουν στο επιθήλιο μέσω μικροτραυματισμών του και μολύνουν τα αρχέγονα κύτταρα της βασικής στιβάδας (εικόνα 11). Αν και η φύση του υποδοχέα της μόλυνσης με HPV δεν έχει πλήρως χαρακτηριστεί, οι περισσότερες μελέτες προτείνουν ότι ο ιός εισέρχεται στο κύτταρο μέσω σύνδεσής του με την θειική ηπαρίνη (HSPG), η οποία αποτελεί συστατικό των πρωτεογλυκανών στην κυτταρική μεμβράνη (Kines et al., 2009). Η αποτελεσματικότερη είσοδος του ιού στα κύτταρα επιτυγχάνεται, όμως, ως επί το πλείστον από την ύπαρξη κι ενός δευτέρου υποδοχέα ή πρωτεογλυκανικού σταθεροποιητή, όπως η α6-ιντεγκρίνη και η λαμίνη-5 που εντοπίζονται στην επιφάνεια των κερατινοκυττάρων (Culpr, TD & Christensen, ND 2006). Μετά την πρόσδεση στον υποδοχέα του, ο ιός εισέρχεται εντός του κυττάρου με ενδοκυττάρωση. Στη συνέχεια, τα καψίδια μεταφέρονται σε ενδοσώματα, όπου υπόκεινται απέκδυση και το ιικό DNA μεταφέρεται στον πυρήνα. Το σύμπλοκο L2 πρωτεΐνης-DNA ελέγχει την σωστή είσοδο του ιικού γονιδιώματος στον πυρήνα, ενώ η L1 παραμένει στα ενδοσώματα έως ότου αποικοδομηθεί πλήρως (Bergant Marusic et al., 2012). Στον πυρήνα των κυττάρων της βασικής στιβάδας, το γενωμικό DNA του ιού παραμένει σε μικρό αριθμό αντιγράφων (50 – 100 αντίγραφα ανά κύτταρο) (Moody and Laimins, 2010). Η διατήρηση του γενώματος του ιού σε αυτή την επισωμική μορφή, είναι σημαντική για την εγκαθίδρυση της πρώιμης φάσης του κύκλου ζωής του (McBride et al., 2006).



**Εικόνα 11:** Ο HPV προσβάλλει ειδικά τα κύτταρα της βασικής στιβάδας του επιθηλίου. Επισημαίνονται οι ικές πρωτεΐνες που παράγονται κατά την πορεία διαφοροποίησης των κυττάρων του ξενιστή

## 5.2. Αντιγραφή του ιού

Ο κύκλος ζωής των HPVs είναι άρρηκτα συνδεδεμένος με το πρόγραμμα διαφοροποίησης των κερατινοκυττάρων. Μετά την είσοδο του ιού στα κερατινοκύτταρα της βασικής στιβάδας, ακολουθεί ο κύκλος ζωής του, εκφράζοντας διαφορετικές πρωτεΐνες σε κάθε στάδιο διαφοροποίησης των κερατινοκυττάρων (εικόνα 11). Η ολοκλήρωση της αναπαραγωγής του ιού γίνεται στις ανώτερες στιβάδες του βλεννογόνου ή του δέρματος, και τα νέα ιικά σωματίδια απελευθερώνονται μέσω απόπτωσης των κυττάρων στα οποία περιέχονται (Schmitt et al., 1996, Egawa, 2003).

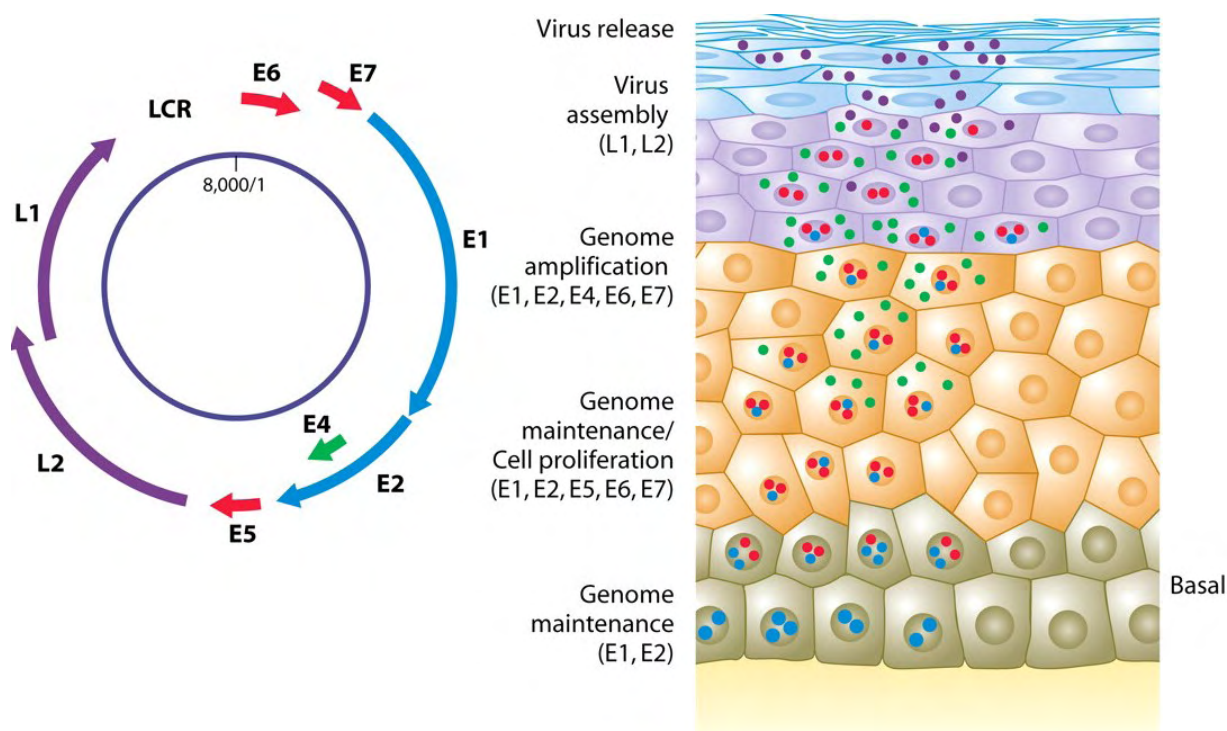
Πιο συγκεκριμένα, αφού ο ιός βρεθεί στην επισωματική μορφή του στον πυρήνα με τη διαδικασία που προαναφέρθηκε, παράγονται αρχικά οι πρωτεΐνες E1 και E2 οι οποίες θεωρούνται απαραίτητες στην αρχική φάση ενίσχυσης, αλλά πιθανόν να χρησιμεύουν και στην διατήρηση του ιικού γονιδιώματος στην επισωματική μορφή, εφόσον ο αριθμός των αντιγράφων σταθεροποιηθεί (Egawa et al., 2012). Η επόμενη φάση αντιγραφής του ιικού

DNA συμβαίνει κατά τη διαίρεση των κερατινοκυττάρων της βασικής στιβάδας, στην φάση S. Όταν τα μολυσμένα κύτταρα του ξενιστή αφήσουν τη βασική στιβάδα, ξεκινούν το πρόγραμμα διαφοροποίησης τους. Επειδή ο HPV δεν κωδικοποιεί DNA πολυμεράση για την αντιγραφή του γενώματός του, απαιτείται η χρήση των μηχανισμών αντιγραφής του ξενιστή. Στην φάση αυτή, το ιικό γονιδίωμα αντιγράφεται παράλληλα με το DNA του κυττάρου-ξενιστή, δημιουργώντας δύο αντίγραφα (ένα σε κάθε θυγατρικό κύτταρο), οδηγώντας στη σταθεροποίηση του ιικού DNA (McBride, 2008, Pyeon et al., 2009, Münger et al., 2004). Στα ανώτερα στρώματα του πολύστιβου επιθηλίου η έκφραση των ιικών γονιδίων που απαιτούνται για την αντιγραφή του HPV DNA αυξάνεται αισθητά (Ozbun and Meyers, 1997), ωθώντας την αντιγραφή του ιικού γονιδιώματος σε χιλιάδες αντίγραφα ανά κύτταρο (Bedell et al., 1991). Εν τούτοις, στα διαφοροποιημένα κύτταρα που εξέρχονται από τον κυτταρικό κύκλο, η αντιγραφική διαδικασία καταστέλλεται. Έτσι, για να επιβεβαιωθεί πως το ιικό γένωμα έχει αντιγραφεί, ο HPV χρειάζεται να επανενεργοποιήσει την κυτταρική διαίρεση στα διαφοροποιούμενα κύτταρα, κάτι το οποίο πραγματοποιεί μέσω της δράσης των πρωτεϊνών E6 και E7 όπως περιγράφηκε προωτέρα (Münger et al., 2004). Στα τελικά διαφοροποιημένα κερατινοκύτταρα, ο ιός πολλαπλασιάζει το DNA του σε ένα μεγάλο αριθμό αντιγράφων, συνθέτει τις καψιδιακές του πρωτεΐνες και προκαλεί την πλήρη συγκρότηση των ιικών σωματιδίων του (εικόνα 11) (Hoffmann et al., 2006).

### **5.3. Μεταγραφή ιικού γονιδιώματος, συναρμολόγηση και απελευθέρωση ιοσωματίων**

Οι Papilloma ιοί διαθέτουν δύο βασικούς υποκινητές: τον πρώιμο και τον όψιμο. Στον HPV-16 ταυτοποιήθηκαν ο p97 και ο p670 ως ο πρώιμος και ο όψιμος υποκινητής, αντίστοιχα. Η μεταγραφική τους δραστηριότητα ελέγχεται κυρίως από την ρυθμιστική περιοχή LCR, διότι εκεί εντοπίζεται ένας μεταγραφικός ενισχυτής, ο οποίος αλληλεπιδρά με αρκετούς μεταγραφικούς παράγοντες (Kajitani et al., 2012). Έχει παρατηρηθεί ότι στα αδιαφοροποίητα κερατινοκύτταρα ή τα ενδιάμεσα διαφοροποιημένα

κερατινοκύτταρα εκφράζονται οι έξι λειτουργικές ρυθμιστικές πρωτεΐνες (E1, E2, E4, E5, E6 και E7) από την πρώιμη περιοχή του ιικού γονιδιώματος (εικόνα 12). Τα έξι πλαίσια ανάγνωσης των ανωτέρω πρώιμων γονιδίων βρίσκονται υπό τον άμεσο έλεγχο του πρώιμου μεταγραφικού υποκινητή p97 και συμβάλλουν στην εγκαθίδρυση της μόλυνσης και την αρχική αντιγραφή του DNA του ιού στο κύτταρο (Zheng and Baker, 2006). Από την άλλη πλευρά, ο όψιμος υποκινητής ενεργοποιείται ειδικά σε διαφοροποιημένες στοιβάδες του επιθηλίου και συμβάλει στην έκφραση των καψιδιακών πρωτεϊνών L1 και L2, οι οποίες είναι απαραίτητες για τον σχηματισμό του ιικού καψιδίου και το πακετάρισμα του ιικού γονιδιώματος στα νεοσχηματιζόμενα ιικά σώματα (Doorbar, 2012).



**Εικόνα 12:** Κύκλος ζωής του ιού. Βάσει χρωμάτων των γονιδίων διακρίνεται η έκφραση τους ανά επίπεδο διαφοροποίησης των κερατινοκυττάρων (Doorbar, 2006).

Για την ολοκλήρωση του κύκλου ζωής του ιού απαιτείται η συναρμολόγηση των πολλαπλών αντιγράφων του ιικού γονιδιώματος εντός των νεοσχηματιζόμενων καψιδίων. Η συναρμολόγηση των νέων μολυσματικών ιικών σωματιδίων λαμβάνει χώρα στην ανώτερη επιθηλιακή στιβάδα (Εικόνα 12). Παράγονται οι καψιδιακές πρωτεΐνες L1 και L2 οι οποίες είναι υπεύθυνες

για την κατασκευή του καψιδίου, ενώ η E2 συμβάλλει στην τοποθέτηση του ιικού γονιδιώματος εντός των καψιδίων (Buck et al., 2004). Τελικά ο ιός απελευθερώνεται από το κερατινοποιημένο κάλυμμα που έχει σχηματιστεί στην κυτταρική επιφάνεια, με την βοήθεια της πρωτεΐνης E1<sup>E4</sup>, χωρίς να προκαλεί λύση των κερατινοκυττάρων (Lehr et al., 2004).

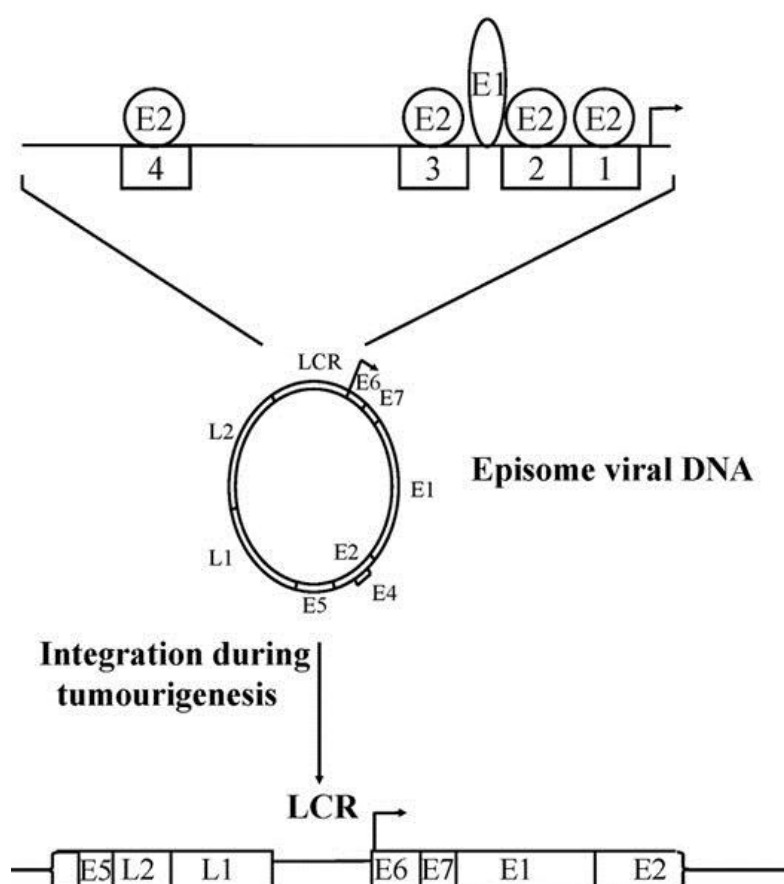
## 6. Φυσική κατάσταση του ιικού γονιδιώματος

### 6.1. Μορφές του γονιδιώματος

Το γονιδίωμα του ιού στα κύτταρα του ξενιστή, μπορεί να βρίσκεται σε μορφή επισώματος ή ενσωματωμένο στο DNA του ξενιστή ή ταυτόχρονα και στις δύο μορφές. Μελέτες έχουν δείξει ότι στο 90% των μολύνσεων από HPV υψηλού κινδύνου, η μόλυνση περιορίζεται λόγω ανοσολογικής απόκρισης του ασθενούς. Στο υπόλοιπο 10% των περιπτώσεων, η μόλυνση εξελίσσεται σε μια διαδικασία μετασχηματισμού των κυττάρων στην οποία απορρυθμίζεται η έκφραση των ιικών ογκογονιδίων E6 και E7 και το κύτταρο οδηγείται σε χρωμοσωμική αστάθεια (Schmitz et al., 2012). Η ενσωμάτωση του HPV-16 στο γένωμα του ξενιστή θεωρείται ως ένα βήμα που σχετίζεται με την εξέλιξη προς νεοπλασία. In vitro μελέτες έδειξαν ότι κυτταρικοί πληθυσμοί με ενσωματωμένο τον HPV-16 κατέχουν αυξητικό πλεονέκτημα σε σύγκριση με κύτταρα που διατηρούσαν τον ιό σε μορφή επισώματος (Jeon and Lambert 1995; Pett et al. 2006). Το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης της E2 έχει ταυτοποιηθεί ως προτιμώμενο σημείο ενσωμάτωσης διότι είναι το συχνότερα διακοπτόμενο ή διαγραμμένο του γονώματος σε σχέση με άλλα σημεία του (Badaracco et al. 2002).

Η ενσωμάτωση του γονιδιώματος του HPV στο DNA του κυττάρου-ξενιστή αποτελεί ένα καθοριστικό βήμα για την τραχηλική καρκινογένεση και η εμφάνισή της σχετίζεται άμεσα με την εξέλιξη της τραχηλικής ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης από CIN II/III σε διηθητικό καρκίνο (Durst et al., 1985, Klaes et al., 1999, Kalantari et al., 2001, Wentzensen et al., 2004, Pett and Coleman, 2007, Schmitz et al., 2012). Η ενσωμάτωση όμως δεν είναι αναγκαία καθώς έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να προκληθεί καρκινογένεση και

από κύτταρα που περιέχουν τον ιό μόνο υπό την επισωματική του μορφή (Vinokurova et al., 2008). Όσον αφορά τον HPV-16, περίπου στο 70% των περιπτώσεων καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, ο ιός βρίσκεται ενσωματωμένος στο DNA του κυττάρου-ξενιστή (Cullen et al., 1991, Badaracco et al., 2002, Fehrman and Laimins, 2003, Doorbar et al., 2012). Η ενσωμάτωση του ιού πραγματοποιείται κατά την διαδικασία επιδιόρθωσης των χρωμοσωμικά ασταθών κυττάρων και θεωρητικά συμβαίνει παράλληλα σε πολλούς κυτταρικούς κλώνους σε ασταθείς περιοχές του γονιδιώματος (Wentzensen., 2004, Ziegert et al., 2003). Παρότι οι κοινές εύθραυστες θέσεις (common fragile sites, CFS) αποτελούν πολύ πιθανούς στόχους προς ενσωμάτωση στο DNA του ξενιστή, η ενσωμάτωση γενικώς είναι ένα τυχαίο γεγονός που κάποιες φορές καταλήγει σε διαγραφή ιικών γονιδίων που ρυθμίζουν τη φυσιολογική μεταγραφή από την LCR (Doorbar et al., 2012).



**Εικόνα 13:** Επισωματική και ενσωματωμένη μορφή του ιικού γονιδιώματος. Η ρήξη συνέβη στην περιοχή του γονιδίου E2.



Για την ενσωμάτωση, το ιικό γονιδίωμα υφίσταται ρήξη η οποία εντοπίζεται συνήθως στο 3' άκρο του ιικού DNA, με αποτέλεσμα να διατηρείται ακέραια η ρυθμιστική περιοχή (LCR) και τα ογκογονίδια E6 και E7 (εικόνα 13). Μελέτες έχουν δείξει ότι οι συνηθέστερες θέσεις ρήξης του γονιδιώματος του ιού είναι τα ρυθμιστικά γονίδια E1 και E2 (Chen et al., 1994, Kalantari et al., 1998, Lukaszuk et al., 2003, Arias Pulido et al., 2006, Cricca et al., 2009), εν τούτοις έχει παρατηρηθεί ρήξη και στα γονίδια L1 και L2 (Li et al., 2013, Xu et al., 2013, Akagi et al., 2014).

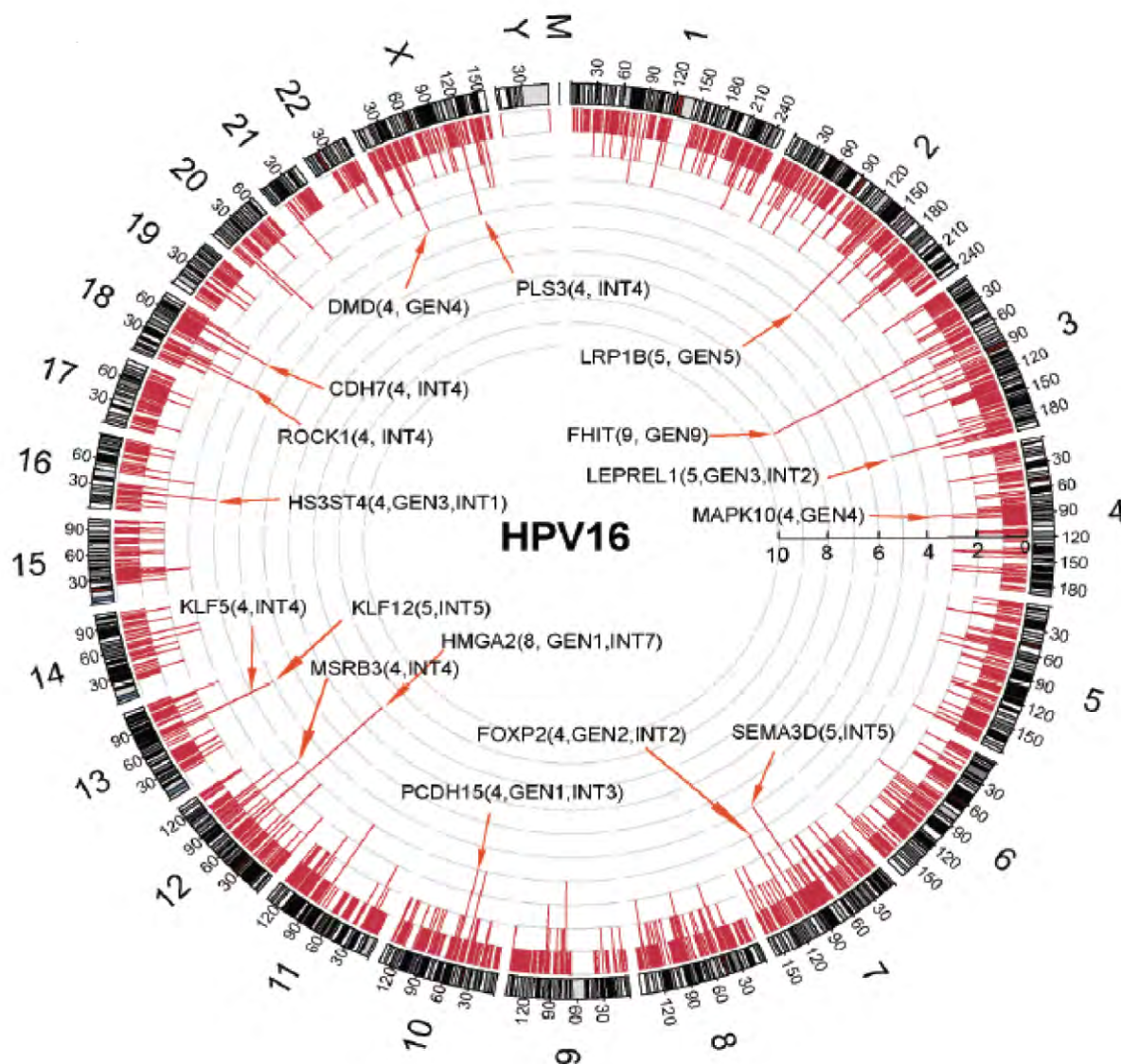
Η ρήξη των γονιδίων E1 και E2 οδηγεί στην απορύθμιση του ελέγχου αντιγραφής επισωματικών αντιγράφων (παύει να εκφράζεται η E1 ελικάση) και στην σταθεροποίηση της έκφρασης των ογκογονιδίων E6 και E7 σε υψηλά επίπεδα (παύει να εκφράζεται και η E2 πρωτεΐνη που είναι ο καταστολέας του πρώιμου υποκινητή) (Arias Pulido et al., 2006, Cricca et al., 2009, Hamid et al., 2009, Kadaja et al., 2009, Thiery, 2009). Η απορύθμιση αυτή οδηγεί σταδιακά σε ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των επιθηλιακών κυττάρων κάτι το οποίο πιθανώς να οδηγήσει σε ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις και καρκίνο (Arias Pulido et al., 2006, Huang et al., 2006, Kulmala et al., 2006, Cricca et al., 2009).

Έχει βρεθεί ότι η ενσωμάτωση του ιού συχνά σχετίζεται με γεγονότα αναδιοργάνωσης, όχι μόνο στο γονιδίωμα του HPV, αλλά και στην περιοχή του κυτταρικού DNA γύρω από την οποία γίνεται η ένθεση. Πιο συγκεκριμένα, έχουν παρατηρηθεί φαινόμενα χρωμοσωμικού αναδιπλασιασμού, αναδιατάξεων, ελλείψεων και μετατοπίσεων. Οι αλλαγές αυτές συνήθως οδηγούν σε γενωμική αστάθεια, γεγονός που πιθανότατα ενισχύει την ογκογένεση (Peter et al., 2010, Akagi et al., 2014). Άγνωστο παραμένει ακόμη εάν η ενσωμάτωση της αλληλουχίας του HPV είναι η αιτία που δημιουργεί αυτές τις δομικές χρωμοσωμικές αλλαγές ή η συνέπεια μιας γενικότερης χρωμοσωμικής αστάθειας.

## 6.2. Θέσεις ενσωμάτωσης

Εκτός από τις θέσεις ρήξης του ιού, σημαντική είναι και η γνώση των θέσεων ενσωμάτωσης του στο χρωμοσωμικό DNA. Ο μηχανισμός της

ενσωμάτωσης περιλαμβάνει τη ρήξη της διπλής έλικας των DNA του ιού και του χρωμοσώματος και την συνένωσή αυτών μέσω κυτταρικών πρωτεϊνών. Παρόλα αυτά, ο ακριβής μηχανισμός δεν έχει εξακριβωθεί πλήρως (Winder et al., 2007). Στην εικόνα 14 απεικονίζονται αναγνωρισμένες θέσεις ενσωμάτωσης με επισήμανση στις συχνότερες από αυτές.



**Εικόνα 14:** Κατανομή των σημείων ενσωμάτωσης του HPV-16 στο ανθρώπινο γονιδίωμα σε 135 δείγματα. Στον εξωτερικό κύκλο (μαύρο χρώμα) απεικονίζονται οι θέσεις ενσωμάτωσης του ιού στα 24 χρωμοσώματα και στο μιτοχondριακό γονιδίωμα του ανθρώπου. Στον εσωτερικό κύκλο, κάθε κόκκινη μπάρα παριστάνει τη συχνότητα ενσωμάτωσης του ιού. Επισημαίνονται κάποιες θέσεις με επαναλαμβανόμενες ενσωματώσεις (GEN: τα σημεία ρήξης βρίσκονται εντός γονιδίων, INT : τα σημεία ρήξης βρίσκονται σε απόσταση μικρότερη των 500kb από γονίδια) (Zheng Hu et al., 2015)

Όπως προαναφέρθηκε, η ενσωμάτωση συμβαίνει συχνά στις κοινές εύθραυστες θέσεις (CFS), αλλά και στην περιοχή διαφόρων γονιδίων που εμπλέκονται στην ανάπτυξη καρκίνου, όπως το ογκογονίδιο Myc (Ferber et al., 2003, Thorland et al., 2000, 2003). Οι CFS αποτελούν χρωμοσωμικούς τόπους γενωμικής αστάθειας, το μέγεθος των οποίων κυμαίνεται από εκατοντάδες kb έως 9 Mb (Richards, 2001, Yu et al., 2005). Αυτές οι περιοχές είναι επιρρεπείς σε δίκλωνες ρήξεις και συνεπώς σε φαινόμενα χρωμοσωμικών ελλείψεων, μετατοπίσεων και αναδιπλασιασμών, επειδή περιέχουν DNA με μεγάλη ελαστικότητα (Glover and Stein 1987, 1988). Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η ενσωμάτωση του ιού δεν γίνεται εντελώς τυχαία και οι θέσεις ενσωμάτωσης τείνουν να εντοπίζονται σε επαναλαμβανόμενες περιοχές του κυτταρικού γονιδιώματος και δίπλα σε γονίδια που σχετίζονται με τον καρκίνο (Li et al., 2013). Επιπλέον πρόσφατη μελέτη απέδειξε ότι πολλές περιοχές του γονιδιώματος του ιού παρουσιάζουν σημαντική ομοιότητα πάνω από 50 νουκλεοτίδια με τα γονίδια στα οποία ενσωματώνονται καθώς και με και τις θέσεις ενσωμάτωσης (Schmitz et al., 2012b).

Η ανάλυση περισσότερων θέσεων ενσωμάτωσης του HPV-16 θα συντελέσει στον προσδιορισμό του τρόπου με τον οποίο ο ιός επιλέγει τις θέσεις ενσωμάτωσης και τον μοριακό μηχανισμό σύμφωνα με τον οποίο ο ιός ενσωματώνεται εντός του κυττάρου-ξενιστή. Γνωρίζοντας τις θέσεις αυτές και ποιες σχετίζονται με καλή ή άσχημη πρόγνωση, πιθανώς να μπορούσε να προσδιοριστεί ο φαινότυπος του δημιουργηθέντος τραχηλικού όγκου καθώς και να δοθούν καθοριστικές πληροφορίες για την θεραπεία του ασθενούς (Yu et al., 2005, Matovina et al., 2009).

### 6.3. Προσδιορισμός φυσικής κατάστασης του ιού

Είναι πλέον αποδεκτό πως η ενσωμάτωση των ιών HPV υψηλού κινδύνου στο γονιδίωμα του ξενιστή αποτελεί μείζονα παράγοντα που συμβάλλει στον μετασχηματισμό σε κακοήθεια. Πολλοί συμφωνούν πλέον με την υπόθεση ότι η ενσωμάτωση λαμβάνει χώρα πολύ νωρίς στην εξέλιξη του καρκίνου. Γι' αυτό το

λόγο έχει διερευνηθεί η φυσική κατάσταση του HPV 16 σε όλα τα επίπεδα τραχηλικής αλλοίωσης (Wei Li et al., 2008).

Κάποιες μελέτες (Nagao et al. 2002; Yoshinouchi et al. 1999) πρότειναν την ανίχνευση των επιπέδων ενσωμάτωσης του HPV-16 μέσω του λόγου E6/E2, ως μια ευαίσθητη μέθοδο η οποία ίσως φανεί χρήσιμη στην εκτίμηση του κινδύνου του τραχηλικού καρκίνου. Όπως προαναφέρθηκε, κατά την ενσωμάτωση του HPV-16 διαγράφεται ή διακόπτεται ένα κομμάτι του γονιδίου της E2 (Arias-Pulido et al., 2006, Kalantari et al., 1998) ενώ το γονίδιο E6 συνήθως παραμένει ανέπαφο. Κατά συνέπεια, για τον έλεγχο της φυσικής κατάστασης του ιού, υπολογίζονται ποσοτικά τα δύο αυτά γονίδια.

Σύμφωνα με την τιμή του λόγου E2/E6, τα δείγματα διαχωρίζονται σε τρεις κατηγορίες: α) E2/E6 ίσος με μηδέν αντιπροσωπεύει τα πλήρως ενσωματωμένα γονιδιώματα, β) E2/E6 που κυμαίνεται μεταξύ 0 και 0,8 αντιπροσωπεύει τη μικτή κατάσταση ενσωματωμένων και επισωματικών γονιδιωμάτων, γ) E2/E6 μεγαλύτερος του 0,8, κυρίως αντιπροσωπεύει την επισωματική μορφή. Πρακτικά, έχει προταθεί ότι μικρή τιμή του λόγου E2/E6 είναι κλινικά σχετιζόμενη με προκαρκινική αλλοίωση. Ακόμα, παρατηρήθηκε εν τέλει πως γενικότερα η τιμή του λόγου E2/E6 είναι σχετική με το βαθμό αλλοίωσης και πως οι γυναίκες ασθενείς με τιμή του λόγου μικρότερη του 0,5, είναι πολύ πιθανό να εμφανίσουν υψηλού βαθμού αλλοίωση (Maele Saunier et al., 2008).

## **B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **1. Κλινικά δείγματα τραχήλου της μήτρας**

Για την παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 69 δείγματα από Ελληνίδες γυναίκες θετικές στον HPV16 ( 55 από ThinPrep και 14 από ιστό σε παραφίνη έπειτα από βιοψία). Είκοσι επτά (27) από αυτά χαρακτηρίστηκαν ως CIN II και III (υψηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακή αλλοίωση πλακώδους επιθηλίου), 34 ως CIN I (χαμηλού βαθμού αλλοίωση) και 8 διαγνώστηκαν ως περιπτώσεις καρκίνου. Το γονιδίωμα του HPV16 ταυτοποιήθηκε με nested multiplex PCR (Sotlar et al., 2004).

### **2. Απομόνωση DNA**

#### **2.1 Απομόνωση από ThinPrep**

Για τα δείγματα από ThinPrep η απομόνωση του DNA πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο της Θειοκυανιούχου Γουανιδίνης (GuSCN) (Casas et al., 1995). Σε πλαστικό σωλήνα των 2ml αναμιγνύονται 100μl δείγματος, 10μl γλυκογόνου (100mg/ml) και 300μl διαλύματος θειοκυανιούχου γουανιδίνης (GuSCN). Ακολουθεί ισχυρή ανάδευση και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου (18-25°C) για 20 min, ώστε να επιτευχθεί η λύση των κυτταρικών μεμβρανών για την απελευθέρωση των νουκλεϊκών οξέων. Στην συνέχεια, προστίθενται 400μl ισοπροπανόλης (διατηρημένης στους -20°C) και έπειτα από ισχυρή ανάδευση τα δείγματα διατηρούνται στους -20°C για 20 min. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10min στις 14.000 rcf στους +4°C και απομάκρυνση του υπερκείμενου. Το ίζημα επαναδιαλύεται με ισχυρή ανάδευση σε 500μl αιθανόλης 70% (διατηρημένης στους -20°C).

Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10min στις 14.000 rcf στους +4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται πλήρως και το ίζημα επαναδιαλύεται σε 100 µl διπλά απιονισμένου νερού (ddH<sub>2</sub>O) (Sigma, USA) απαλλαγμένου ριβονουκλεασών (RNase, Dnase free). Το απομονωμένο DNA αποθηκεύεται στους -20°C μέχρι την περαιτέρω χρήση του.

#### **Διαλύματα:**

Διάλυμα Θειοκυανιούχου Γουανιδίνης: 4M GuSCN, 0.5% N-lauroyl sacrosine, 1mM dithiotreitol, 25 mM sodium citrate.

## **2.2. Απομόνωση από παραφίνη**

Για τον τραχηλικό ιστό μονιμοποιημένο σε παραφίνη, η απομόνωση του DNA έγινε με την χρήση της πρωτεΐνάσης K (Tsakogiannis et al., 2012). Τομές τραχηλικού ιστού μονιμοποιημένου σε παραφίνη, διαμέτρου 5-10µm απομακρύνονται με την χρήση νυστεριού και τοποθετούνται σε πλαστικό σωλήνα των 2ml. Ακολουθεί ισχυρή ανάδευση με 400µl ξυλόλης και φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 5min. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και ακολουθεί ισχυρή ανάδευση του ιζήματος με 400µl αιθανόλης (96%). Στη συνέχεια, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 5min στους +4°C και απομάκρυνση του υπερκειμένου. Ακολουθεί η προσθήκη 50-200µl διαλύματος εκχύλισης 1X και ολονύκτια επώαση στους 37°C. Για την απενεργοποίηση της πρωτεΐνάσης K πραγματοποιείται επώαση στους 65°C για 15 min. Τέλος, με σύντομη φυγοκέντρηση του διαλύματος στους +4°C, συλλέγεται το υπερκείμενο και αποθηκεύεται το DNA στους -20°C.

#### **Διαλύματα:**

Διάλυμα εκχύλισης: 10µl πρωτεΐνάση K (20µg/µl), 100µl PCR ρυθμιστικού διαλύματος 10 X (Stratagene, La Jolla USA), 890µl διπλά απιονισμένο νερό απαλλαγμένο νουκλεασών (Sigma, USA).

## **2.3. Έλεγχος της απομόνωσης DNA**

Η επιβεβαίωση της ακεραιότητας του DNA που απομονώθηκε και ο έλεγχος της παρουσίας αναστολέων της αντίδρασης PCR, πραγματοποιήθηκε μέσω της ενίσχυσης με PCR τμήματος του γονιδίου GAPDH, μεγέθους 250bp (Li et al., 2008).

### 3. Ηλεκτροφόρηση

Η επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση των προϊόντων των PCR σε πήκτωμα αγαρόζης με συγκέντρωση 2%. Συγκεκριμένα, 1,2 g αγαρόζης (Invitrogen, UK) και 60 ml TBE 1% (Tris, Boric acid, EDTA) προστίθενται σε κωνική φιάλη των 250 ml. Το μείγμα θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων για περίπου 1 min, ώστε να λιώσει η αγαρόζη και αφήνεται να κρυώσει (περίπου στους 40°C). Προστίθεται διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr<sub>2</sub>), ώστε η τελική του συγκέντρωση να είναι 1 µg/ml. Το βρωμιούχο αιθίδιο παρεμβάλλεται μεταξύ των ζευγαριών βάσεων του δίκλωνου DNA φθορίζοντας σε μήκος κύματος 290 nm. Ύστερα από καλή ανάδευση το διάλυμα τοποθετείται σε ειδική θήκη ηλεκτροφόρησης προκειμένου να πήξει η αγαρόζη. Από το προϊόν της Nested PCR, 10 µl αναμιγνύονται με 2 µl χρωστικής (κυανό της βρωμοφαινόλης, σε 40% w/v σουκρόζης, σε TBE) και μεταφέρονται στο πήκτωμα αγαρόζης. Για τον προσδιορισμό του μήκους των προϊόντων της Nested PCR χρησιμοποιείται ο μάρτυρας μοριακών βαρών, 100 bp DNA Ladder (Invitrogen, UK). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε ένταση 120 Volts, 50 mA για 1 h περίπου. Στη συνέχεια, το πήκτωμα αγαρόζης τοποθετείται σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας (Foto UV15, Fotodyne, Hartland WI), όπου ελέγχεται και φωτογραφίζεται.

### 4. Κατασκευή πλασμιδίων

Με σκοπό τον προσδιορισμό των λόγων E2/E6 και E1/E6 των αριθμών αντιγράφων DNA του ιού, διεξήχθη αντίδραση ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (real time PCR). Για την κανονικοποίηση των αναλύσεων της αντίδρασης αυτής, κατασκευάστηκε πλασμίδιο το οποίο περιείχε την ιική περιοχή από το γονίδιο E2 έως το E6 (pE6-E2), (ποσοτικοποίηση E1, E2 και E6) και ένα δεύτερο πλασμίδιο με τμήμα του GAPDH γονιδίου (pGAPDH) (ποσοτικοποίηση του κυτταρικού DNA).

#### 4.1. Κατασκευή του pE6-E2

Για τη κατασκευή του πλασμιδίου pE6-E2 ενισχύθηκε η αλληλουχία μεταξύ των νουκλεοτιδίων 123 έως 3912 με την βοήθεια των εκκινητικών μορίων HPV16 41 5'-AGCGACCCAGAAAGTTACCA-3' / HPV16 3912 GCACACAAAGCAAAGCAAAA. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε εκχυλισμένο δείγμα που χαρακτηρίστηκε ως πρότυπο στέλεχος. Η αντίδραση της PCR για την ενίσχυση της περιοχής μεταξύ των γονιδίων E6 και E2 πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 50μl. Η αντίδραση περιείχε 3μl DNA, 2μl εκκινητικών μορίων (1μl από τον καθένα με συγκέντρωση 50pmol/μl), 5μl 10X ρυθμιστικού διαλύματος (GeneON) περιεκτικότητας 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5μl μείγματος νουκλεοτιδίων (dNTPs 10mM, Invitrogen, USA), 2.5U Taq DNA πολυμεράσης (Maximo Taq DNA Polymerase, GeneON) και ddH<sub>2</sub>O μέχρι τον τελικό όγκο των 50μl. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε με ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης του DNA στόχου στους 95°C για 5min και ακολούθησαν 40 κύκλοι αποδιάταξης στους 95°C για 40sec, υβριδοποίησης στους 55°C για 40sec και επιμήκυνσης στους 72°C για 4min. Τέλος στην αντίδραση περιλήφθηκε ένα τελικό στάδιο επιμήκυνσης στους 72°C για 10min για πλήρη σύνθεση των μη ολοκληρωμένων νεοσυντιθέμενων προϊόντων.

Στη συνέχεια, το ενισχυμένο προϊόν μεγέθους 3791 ζευγών βάσεων υποβλήθηκε σε μοριακή κλωνοποίηση με την χρήση του StataClone PCR cloning kit (Stratagene, Agilent technologies), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η απομόνωση του ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού φορέα από μετασχηματισμένες βακτηριακές αποικίες πραγματοποιήθηκε με το Nucleospin plasmid kit (Macherey- Nagel GmbH, Duren, Germany), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε αλληλούχιση και των δύο κλώνων του ενθέματος από την εταιρία MacroGen (Seoul, Korea) για να διαπιστωθεί η ειδικότητα του προϊόντος. Για την αντίδραση της αλληλούχισης χρησιμοποιήθηκαν ως εκκινητές οι επαγωγείς T3 και T7 του πλασμιδιακού φορέα που βρίσκονται εκατέρωθεν της θέσης ένθεσης του τμήματος DNA. Ο αριθμός των αντιγράφων του pE6-E2 προσδιορίστηκε μέσω real time-PCR, ενισχύοντας τμήμα του γονιδίου E6. Σειριακές υποδεκαλάσιες αραιώσεις από 10<sup>6</sup> έως 1 αντίγραφο του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου (pE6-E2) υποβλήθηκαν σε PCR με όλα τα ζεύγη εκκινητικών μορίων που χρησιμοποιήθηκαν από τη βιβλιογραφία κατά



τη χαρτογράφηση των E1 και E2 γονιδίων (Li et al., 2008, Arias- Pulido et al., 2006). Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε για να προσδιοριστεί και να βελτιωθεί η ευαισθησία της μεθόδου και εφαρμόστηκε τρεις φορές για κάθε ζεύγος εκκινητικών μορίων.

#### 4.2. Κατασκευή pGAPDH και pE6

Για τη κατασκευή του πλασμιδίου pGAPDH, πραγματοποιήθηκε PCR για την ενίσχυση τμήματος του GAPDH γονιδίου σε εκχυλισμένο δείγμα κυτταρικής σειράς CaSki (Li et al., 2008). Στη συνέχεια το προϊόν της αντίδρασης υποβλήθηκε σε μοριακή κλωνοποίηση με το StataClone PCR cloning kit (Stratagene, Agilent technologies), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Επιπρόσθετα, για την πραγματοποίηση πειραμάτων προσομοίωσης κατασκευάστηκε ένα ακόμα πλασμίδιο μετά από ενίσχυση τμήματος του E6 γονιδίου προερχόμενο από το κλινικό δείγμα το οποίο περιείχε το πρότυπο στέλεχος του ιού. Το πλασμίδιο αυτό κατασκευάστηκε μετά από ενίσχυση τμήματος του E6 γονιδίου με την χρήση των εκκινητικών μορίων HPV16 1 5'- GCACAGAGCTGCAAACAACT-3' / HPV16 353 5'-GGTCCACCGACCCCTTATATT-3', όπως περιγράφηκε στην ενότητα B5.1. Στη συνέχεια το προϊόν της αντίδρασης υποβλήθηκε σε μοριακή κλωνοποίηση με το StataClone PCR cloning kit (Stratagene, Agilent technologies), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

### 5. Χαρτογράφηση των E1 και E2 γονιδίων

Ο προσδιορισμός των θέσεων ρήξης εντός των E1 και E2 γονιδίων πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο της PCR, χρησιμοποιώντας αλληλεπικαλυπτόμενα εκκινητικά μόρια από την βιβλιογραφία (Li et al., 2008, Arias- Pulido et al., 2006). Τα εκκινητικά μόρια που χρησιμοποιήθηκαν ενισχύουν σε επιμέρους τμήματα ολόκληρο το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης των E1 και E2 γονιδίων, με σκοπό να προσδιοριστούν τα σημεία στα οποία το γονιδίωμα του ιού έχει υποστεί ρήξη, λόγω ενσωμάτωσης του HPV16 DNA στο κυτταρικό γονιδίωμα. Όλες οι αντιδράσεις της PCR για την ενίσχυση των

επιμέρους τμημάτων των E1 και E2 γονιδίων, πραγματοποιήθηκαν σε τελικό όγκο 50μl. Σε όλες τις αντιδράσεις χρησιμοποιήθηκαν 3μl DNA από κάθε δείγμα, 2μl εκκινητικών μορίων (1μl από τον καθένα με συγκέντρωση 50pmol/μl), 5μl 10X ρυθμιστικού διαλύματος (Stratagene, La Jolla, USA) περιεκτικότητας 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 5μl μείγματος νουκλεοτιδίων (dNTPs 10mM, Invitrogen, USA), 2.5U Paq DNA πολυμεράσης (Paq5000TM DNA Polymerase, Stratagene, La Jolla, USA) και ddH<sub>2</sub>O μέχρι τελικό όγκο 50μl. Σε κάθε αντίδραση πραγματοποιήθηκε ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης του DNA στόχου στους 95°C για 2min και ακολούθησε η εφαρμογή διαφορετικών συνθηκών αποδιάταξης, υβριδοποίησης και επιμήκυνσης, για κάθε ζεύγος ξεχωριστά για 40 κύκλους. Όλες οι αντιδράσεις περιλάμβαναν ένα τελικό στάδιο επιμήκυνσης στους 72°C για 5min για πλήρη σύνθεση των μη ολοκληρωμένων νεοσυντιθέμενων προϊόντων. Η επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων έγινε σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 2%.

## 6. Προσδιορισμός της μορφής γονιδιώματος του HPV16

### 6.1. PCR Πραγματικού Χρόνου (Real Time PCR)

Ο προσδιορισμός της μορφής του γονιδιώματος του HPV16 (επισωματική μορφή, ενσωματωμένη μορφή, μικτή μορφή) πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της Real time-PCR και τη χρήση φθορίζουσας χρωστικής SYBR Green I. Για να προσδιοριστεί η μορφή του γονιδιώματος του ιού πραγματοποιήθηκε αρχικά ποσοτικοποίηση των γονιδίων E1, E2, E6 και υπολογίστηκε ο λόγος των τιμών E1/E6 και E2/E6 για κάθε δείγμα ξεχωριστά. Η βασική αρχή της μεθόδου βασίζεται στην υπόθεση ότι τα γονίδια E1, E2 και E6 παρουσιάζουν ίση ποσότητα αντιγράφων όταν ο ιός βρίσκεται στην επισωματική μορφή, ενώ το γεγονός αυτό αναιρείται όταν το γονιδίωμα του ιού υφίσταται ρήξη στη περιοχή των γονιδίων E1 ή/και E2 κατά την διαδικασία ενσωμάτωσης του ιού στο γονιδίωμα του κυττάρου ξενιστή.

Η επιλογή εκκινητικών μορίων για την ποσοτικοποίηση των γονιδίων E1 και E2 βασίστηκε στον εντοπισμό θέσεων που παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη συχνότητα ρήξης, όπως προέκυψε από την χαρτογράφηση των θέσεων ρήξης των γονιδίων E1 και E2. Πιο συγκεκριμένα, η πιο συχνή θέση ρήξης του E2 γονιδίου εντοπίζεται στην περιοχή μεταξύ των νουκλεοτιδίων 3172 και 3649, ενώ για το E1 γονίδιο η πιο συχνή θέση εντοπίζεται στο 5' άκρο του γονιδίου μεταξύ των νουκλεοτιδίων 1059 και 1323. Επομένως, για τον ποσοτικό προσδιορισμό του E2 γονιδίου χρησιμοποιήθηκε ζεύγος εκκινητών που ενισχύει τη περιοχή μεταξύ των νουκλεοτιδίων 3243 και 3539 (E2F12-E2R12), ενώ η ποσοτικοποίηση του E1 γονιδίου πραγματοποιήθηκε με ζεύγος εκκινητών που ενισχύουν την περιοχή μεταξύ των νουκλεοτιδίων 1059 και 1323 (E1F2-E1R2) (Πίνακας 1). Οι αντιδράσεις σε κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκαν σε συνολικό αριθμό 500 αντιγράφων κυτταρικού DNA, όπως αυτό υπολογίστηκε μετά την ποσοτικοποίηση τμήματος του γονιδίου GAPDH.

Η κατασκευή πρότυπης καμπύλης για τα γονίδια E1, E2, E6 και GAPDH έγινε ξεχωριστά για κάθε γονίδιο στόχο. Όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν με το SYBR® FAST qPCR Kit (KAPA, Boston, Massachusetts, United States) και στη συσκευή Mx3000P® (Stratagene). Κάθε αντίδραση περιελάμβανε 3μl πλασμιδιακού DNA, 2μl εκκινητικών μορίων (1μl από τον κάθε ένα εκκινητή με συγκέντρωση 10pmol/μl), 10μl 2X μείγματος αντίδρασης (KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix), 0.4μl χρωστικής αναφοράς ROX και ddH<sub>2</sub>O μέχρι τελικό όγκο 25μl. Σε κάθε αντίδραση πραγματοποιήθηκε ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης του DNA στόχου στους 95°C για 1min και ακολουθούν 40 κύκλοι αποδιάταξης στους 95°C για 3sec, υβριδοποίησης στους 60°C για 20sec και επιμήκυνσης στους 60°C για 10sec. Τέλος η αντίδραση περιλαμβάνει ένα τελικό στάδιο κατασκευής καμπύλης τήξης των ενισχυμένων προϊόντων, που κυμαίνεται από 55°C έως 95°C. Η συλλογή των αποτελεσμάτων έγινε στους 72°C στα 510nm

Η πρότυπη καμπύλη που κατασκευάστηκε για το γονίδιο GAPDH πραγματοποιήθηκε μέσω ενίσχυσης υποδεκαπλάσιων αραιώσεων του πλασμιδίου pGAPDH, που κυμαίνονταν από 1 έως 10<sup>8</sup> αντίγραφα του γονιδίου. Επιπλέον τρεις διαφορετικές πρότυπες καμπύλες κατασκευάστηκαν

για τους στόχους των E1, E2 και E6 γονιδίων χρησιμοποιώντας το πλασμίδιο pE6-E2. Οι πρότυπες καμπύλες κατασκευάστηκαν με την χρήση υποδεκαπλάσιων αραιώσεων του πλασμιδίου pE6-E2, που κυμαίνονταν από 1 έως  $10^8$  αντίγραφα του πλασμιδίου. Όλες οι αντιδράσεις για την κατασκευή των πρότυπων καμπυλών πραγματοποιήθηκαν τρεις φορές, ενώ όλα τα κλινικά δείγματα εξετάστηκαν εις διπλούν. Ο αριθμός των αντιγράφων των E1, E2 και E6 γονιδίων καθορίστηκε για κάθε δείγμα, με βάση τον αριθμό των κυττάρων (500 αντίγραφα του κυτταρικού γονιδιώματος), όπως προέκυψε από τη ποσοτικοποίηση του GAPDH γονιδίου και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως E1, E2 και E6 αντίγραφα/ 500 κύτταρα.

Εκκινητές	Αλληλουχία (5'-3')	Θέση	Μέγεθος προϊόντος
<b>Στόχος: E1</b>			
E1F2	GACAGCACATGCGTTGTTTAC	1059	265 bp
E1R2	AGTCTCATGGCGCCCTTC	1323	
<b>Στόχος: E2</b>			
E2F12	GAATACGAACATATTTTGTGCAG	3243	297 bp
E2R12	CTGAGTCTCTGTGCAACAACCTTA	3539	
<b>Στόχος: E6</b>			
HPV16 1	GCACAGAGCTGCAAACAACCT	150	353 bp
HPV16 353	GGTCCACCGACCCCTTATATT	502	
<b>Στόχος: GAPDH</b>			
GAPDH F	ACGGATTTGGTCGTATTGGG		250 bp
GAPDH R	TGATTTTGGAGGGATCTCGC		

**Πίνακας 1:** Παρουσίαση των εκκινητών για τη ποσοτικοποίηση των E1, E2, E6 και GAPDH γονιδίων. Στον πίνακα αναγράφεται η αντίστοιχη αλληλουχία των εκκινητών καθώς και το μέγεθος του προϊόντος που προκύπτει.

## 6.2. Καθορισμός του εύρους των τιμών E1/E6 και E2/E6

Για να προσδιοριστεί η μορφή του γονιδιώματος του ιού για κάθε κλινικό τραχηλικό δείγμα, υπολογίστηκε το εύρος των τιμών E1/E6 και E2/E6 που διαχωρίζουν την επισωματική, την ενσωματωμένη και τη μικτή μορφή του γονιδιώματος του ιού. Η πειραματική προσέγγιση των ορίων πραγματοποιήθηκε με την δημιουργία διαλυμάτων πλασμιδίων, που περιείχαν μια σταθερή ποσότητα (100 αντίγραφα) του πλασμιδίου pE6-E2 και διαφορετικές ποσότητες του πλασμιδίου pE6, που κυμαίνονταν από 0 έως  $10^5$  αντίγραφα (πίνακας 2). Το διάλυμα πλασμιδίου που περιείχε μόνο το πλασμίδιο pE6-E2, αξιολογήθηκε ως η επισωματική μορφή του γονιδιώματος του ιού. Αντιθέτως το διάλυμα πλασμιδίου που περιείχε μόνο το πλασμίδιο pE6 αξιολογήθηκε ως η ενσωματωμένη μορφή του πλασμιδίου. Ο λόγος των τιμών E1/E6 και E2/E6 υπολογίστηκε για όλα τα διαλύματα πλασμιδίων ξεχωριστά.

## 6.3. Στατιστική μελέτη των αποτελεσμάτων

Η στατιστική επεξεργασία των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο  $\chi^2$  (Chi-square test) με διόρθωση του Yates (Yates' correction) ή με τον ακριβή έλεγχο Fisher (Fisher's exact test) σε 2 x 2 πίνακα συνάφειας (Contingency table) που δημιουργείται με βάση τις παρατηρούμενες τιμές και τη βοήθεια του προγράμματος GraphPad Prism v. 4.00 (GraphPad Software, San Diego, CA), το οποίο διατίθεται στο διαδίκτυο. Η μέθοδος του  $\chi^2$  ανήκει στην κατηγορία των ονομαστικών μεταβλητών και χρησιμοποιείται στη περίπτωση που τα δείγματα είναι ανεξάρτητα μεταξύ τους, ενώ ο ακριβής έλεγχος Fisher χρησιμοποιείται όταν ο αριθμός των δειγμάτων είναι μικρός. Η τιμή P θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική σε τιμές μικρότερες του 0.05. Η τιμή P καθορίζει το παρατηρούμενο επίπεδο της στατιστικής σημαντικότητας που υπολογίζεται με τη χρήση του κατάλληλου στατιστικού μοντέλου.

## Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 1. Χαρτογράφηση των γονιδίων E1 και E2

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκαν 69 δείγματα τραχήλου της μήτρας θετικά στον ιό HPV16, με σκοπό να προσδιοριστεί η φυσική κατάσταση του ιικού γονιδιώματος μέσω των τιμών των λόγων E2/E6 και E1/E6. Σε πολλές περιπτώσεις τα φαινόμενα ρήξης εμφανίζονται στο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης των E1 και E2 γονιδίων. Για το λόγο αυτό, αρχικά πραγματοποιήθηκε εκτενής ανάλυση χαρτογράφησης των γονιδίων αυτών σε όλα τα δείγματα με PCR, όπου χρησιμοποιήθηκαν 12 ζευγάρια αλληλεπικαλυπτόμενων εκκινητικών μορίων (Li et al., 2008, Arias- Pulido et al., 2006) που ενισχύουν σε επιμέρους τμήματα, ολόκληρα τα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης των γονιδίων E1 και E2. Τα δείγματα αυτά είχαν χαρακτηριστεί από κυτταροπαθολόγους ως εξής: 27 ως CIN II και III( υψηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακή αλλοίωση πλακώδους επιθηλίου), 34 ως CIN I (χαμηλού βαθμού αλλοίωση) και 8 ως καρκινικά. Ως γεγονότα ρήξης χαρακτηρίστηκαν οι περιπτώσεις των δειγμάτων που δεν έδωσαν ζώνη ενίσχυσης μετά από τη PCR, αλλά ενισχύθηκε το τμήμα του γονιδίου της β-ακτίνης και του γονιδίου E6. Η ενίσχυση του γονιδίου E6 πραγματοποιήθηκε με σκοπό να εξεταστεί η ακεραιότητα του γονιδιώματος του HPV16, έτσι ώστε να προσδιορισθεί αν η ρήξη εντός των γονιδίων E1 και E2 οφείλεται στην ενσωμάτωση του ιού στο κυτταρικό γονιδίωμα και όχι στον κατακερματισμό του γονιδιώματος του ιού.

Από την ενίσχυση του γονιδίου E2, παρατηρήθηκε η συχνότερη ρήξη στη θέση η οποία κωδικοποιεί την περιοχή "αρμό" της E2 πρωτεΐνης μεταξύ των νουκλεοτιδίων 3172 και 3649. Όσον αφορά το γονίδιο E1, η επικρατέστερη περιοχή προς ρήξη φάνηκε να βρίσκεται κοντά στο 5' άκρο

του γονιδίου, μεταξύ των νουκλεοτιδίων 1059 και 1323. Επιπλέον, αναλύσεις των δύο αυτών γονιδίων στα ίδια τραχηλικά δείγματα έδειξαν ότι οι αλληλουχίες των προαναφερθεισών συχνών περιοχών ρήξης είναι συντηρημένες σε απομονωμένους HPV16 που κυκλοφορούν στον ελληνικό πληθυσμό (Tsakogiannis et al., 2012, 2013, 2014). Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω δεδομένα, για τον προσδιορισμό του αριθμού αντιγράφων των γονιδίων E1 και E2, η Real Time PCR εφαρμόστηκε στοχεύοντας τις συντηρημένες αυτές περιοχές.

## 2. Καθορισμός του εύρους των τιμών E2/E6 και E1/E6

Για να προσδιοριστούν τα όρια των τιμών των λόγων E2/E6 και E1/E6 σχετικά με την κάθε μορφή του γονιδιώματος του HPV16 την οποία υποδεικνύουν (επισωματική, ενσωματωμένη και μικτή μορφή), χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα πλασμιδίων που περιείχαν 100 αντίγραφα του πλασμιδίου pE6-E2, ως επισωματική μορφή του γονιδιώματος του ιού, και ποσότητες από 0 έως  $1 \times 10^5$  αντίγραφα του πλασμιδίου pE6, ως ενσωματωμένη μορφή του γονιδιώματος του ιού (Πίνακας 2).. Στη συνέχεια, προσδιορίστηκε ο αριθμός των αντιγράφων των γονιδίων E1, E2 και E6 με τη μέθοδο της Real time PCR. Από την ανάλυση του λόγου των τιμών βρέθηκε ότι τιμές κοντά στο μηδέν (τιμή λόγου E1/E6 < 0.003 και E2/E6 < 0.001) υπολογίζονται όταν το πλασμίδιο pE6 βρίσκεται σε εκατονταπλάσια περίσσεια του πλασμιδίου pE6-E2. Οι τιμές E1/E6 = 0.03 και E2/E6 = 0.01 παρατηρούνται όταν, στο διάλυμα των πλασμιδίων, το pE6 βρίσκεται σε δεκαπλάσια περίσσεια ενώ οι τιμές E1/E6 = 0.52 και E2/E6 = 0.62 παρατηρούνται όταν το διάλυμα περιέχει ίση ποσότητα των pE6-E2 και pE6 πλασμιδίων (100 αντίγραφα). Τέλος, όταν η συγκέντρωση του pE6-E2 είναι σε δεκαπλάσια περίσσεια στο διάλυμα τότε οι τιμές των λόγων είναι E1/E6 = 0.7 και E2/E6 = 0.82 και όταν το διάλυμα των πλασμιδίων περιέχει μόνο το πλασμίδιο pE6-E2 (επισωματική μορφή του ιού), υπολογίζονται οι τιμές E1/E6 = 0.98 και E2/E6 = 0.96 (Πίνακας 2).

Κατά συνέπεια και δεδομένων των παραπάνω υπολογισμών, η ενσωμάτωση του ιού συμβαίνει όταν E1/E6 < 0.003. Σε τιμές μεταξύ 0.003 έως 0.98 ο ιός βρίσκεται και στις δύο μορφές, ενώ σε τιμές E1/E6  $\geq 0.98$ , ο ιός

βρίσκεται υπό την επισωματική του μορφή (Πίνακας 2). Επίσης, όσον αφορά τις τιμές E2/E6 παρατηρείται ότι η ενσωμάτωση του ιού συμβαίνει σε τιμές μικρότερες από 0.001, μεταξύ των τιμών 0.001 και 0.96 παρουσιάζεται η μικτή μορφή του γονιδιώματος του, ενώ σε τιμές μεγαλύτερες ή ίσες με 0.96 παρατηρείται η επισωματική μορφή του γονιδιώματος του HPV16.

<b>Αριθμός Διαλύματος</b>	<b>Διάλυμα πλασμιδίων</b>		<b>Τιμή Λόγου</b>		<b>Μορφή DNA του HPV16</b>
	<b>Αντίγραφα pE6-E2</b>	<b>Αντίγραφα pE6</b>	<b>E1/E6</b>	<b>E2/E6</b>	
1	100	0	0,98	0,96	Επισωματική
2	100	10	0,7	0,82	Μικτή
3	100	100	0,52	0,62	Μικτή
4	100	1000	0,03	0,01	Μικτή
5	100	10000	0,003	0,001	Ενσωματωμένη
6	100	100000	0	0	Ενσωματωμένη

**Πίνακας 2:** Περιγραφή των διαλυμάτων των πλασμιδίων που χρησιμοποιήθηκαν για τον καθορισμό του εύρους των τιμών που καθορίζουν τη μορφή του γονιδιώματος του HPV16. Ο λόγος των τιμών E1/E6 και E2/E6 υπολογίστηκε για όλα τα διαλύματα πλασμιδίων.

### 3. Ανάλυση των τιμών των E1/E6, E2/E6

#### 3.1. Προσδιορισμός των E1/E6, E2/E6

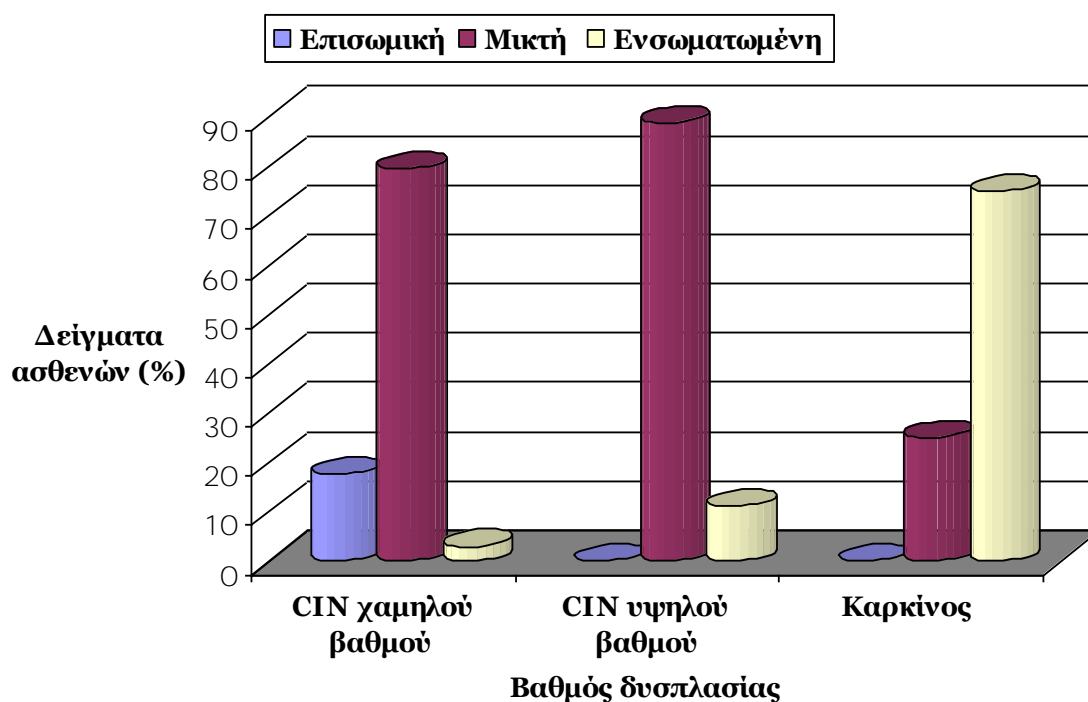
Η ανάλυση των λόγων E1/E6 και E2/E6 πραγματοποιήθηκε στα ίδια τραχηλικά δείγματα με HPV16 για τον προσδιορισμό της φυσικής κατάστασης του γονιδιώματος του. Από τα 34 δείγματα με χαμηλό βαθμό ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης (CIN I) που αναλύθηκαν, η επισωματική μορφή του ιού βρέθηκε μόνο σε 6 εξ αυτών (17,6%). Ωστόσο, η αποκλειστικά επισωματική μορφή δεν εμφανίστηκε σε κανένα από τα δείγματα με υψηλού βαθμού δυσπλασίες ή καρκίνο. Η μικτή μορφή του γονιδιώματος παρουσιάστηκε σε 27 από τα 34



(79,5%) αυτά δείγματα καθώς και σε 24 από τα 27 (88,8%) δείγματα με υψηλού βαθμού αλλοίωση (CIN II, III). Επιπλέον, η μικτή μορφή ανιχνεύτηκε και σε 2 εκ των 8 (25%) δειγμάτων με καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Ακόμη, η αποκλειστικά ενσωματωμένη μορφή του ιικού γονιδιώματος αναγνωρίστηκε σε 3 εκ των 27 (11,1%) δειγμάτων με υψηλό βαθμό αλλοίωσης και σε 6 εκ των 8 (75%) δειγμάτων με καρκίνο. Τέλος, η αποκλειστικά ενσωματωμένη μορφή του ιού ανιχνεύτηκε και σε ένα δείγμα χαμηλού βαθμού αλλοίωσης (2,9%) (πίνακας 3 και εικόνα 15).

<b>Φυσική κατάσταση γονιδιώματος ιού</b>	<b>CIN χαμηλού βαθμού [n (%)]</b>	<b>CIN υψηλού βαθμού [n (%)]</b>	<b>Καρκίνος [n (%)]</b>
<b>Επισωματική</b>	6 (17,6)	0 (0)	0 (0)
<b>Μικτή</b>	27 (79,5)	24 (88,8)	2 (25)
<b>Ενσωματωμένη</b>	1 (2,9)	3 (11,1)	6 (75)
<b>Σύνολο</b>	34 (100)	27 (100)	8 (100)

**Πίνακας 3:** Φυσική κατάσταση γονιδιώματος του HPV16 ανάλογα με την κυτταρολογική διάγνωση των δειγμάτων των ασθενών.



**Εικόνα 15:** Διαγραμματική απεικόνιση του ποσοστού των δειγμάτων, για κάθε φυσική κατάσταση του γονιδιώματος που ανιχνεύτηκε, σε σχέση με τον χαρακτηρισμένο βαθμό δυσπλασίας.

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω αποτελέσματα, συμπεραίνεται ότι η αποκλειστικά επισωματική μορφή (πίνακας 4) του ιικού DNA ανιχνεύεται μόνο σε χαμηλού βαθμού αλλοιώσεις (17,4%), ενώ η αποκλειστικά ενσωματωμένη (πίνακας 5) μορφή απαντάται κατά κύριο λόγο στις περιπτώσεις καρκίνου (75%). Ωστόσο, παρουσιάστηκε αξιοσημείωτη συσχέτιση μεταξύ της μικτής μορφής του γονιδιώματος και των δειγμάτων με CIN υψηλού βαθμού, σε σύγκριση με την επισωματική (0%) και την ενσωματωμένη μορφή (11,1%) ( $\chi^2 = 16,333$ ,  $P < 0.0001$ ). Επιπλέον, φάνηκε ισχυρή συσχέτιση των δειγμάτων χαμηλού βαθμού αλλοίωσης με τη μικτή μορφή γονιδιώματος, σε σύγκριση με την επισωματική (17,6%) και την ενσωματωμένη (2,9%) ( $\chi^2 = 11,7$ ,  $P < 0.0006$ ).

<b>Δείγμα</b>	<b>Βαθμός αλλοίωσης</b>	<b>E1/E6</b>	<b>E2/E6</b>	<b>Μορφή</b>
ATT10	Χαμηλός	0,98	1	επίσωμα
ATT23	Χαμηλός	0,99	0,98	επίσωμα
ATT26	Χαμηλός	0,98	1	επίσωμα
858	Χαμηλός	0,99	0,98	επίσωμα
2279	Χαμηλός	0,99	0,98	επίσωμα
2290	Χαμηλός	0,99	0,97	επίσωμα

**Πίνακας 4:** Παρουσίαση των δειγμάτων που φέρουν την επισωματική μορφή του γονιδιώματος του ιού βάσει των τιμών και των δύο λόγων E1/E6 και E2/E6

<b>Δείγμα</b>	<b>Βαθμός αλλοίωσης</b>	<b>E1/E6</b>	<b>E2/E6</b>	<b>Μορφή</b>
747	Χαμηλός	0	0	ενσωματωμένη
D13	Υψηλός	0	0	ενσωματωμένη
D14	Υψηλός	0	0	ενσωματωμένη
D15	Υψηλός	0	0	ενσωματωμένη
D58	Καρκίνος	0	0	ενσωματωμένη
D59	Καρκίνος	0	0	ενσωματωμένη
D60	Καρκίνος	0	0	ενσωματωμένη
D64	Καρκίνος	0,002	0	ενσωματωμένη
D65	Καρκίνος	0	0	ενσωματωμένη
D66	Καρκίνος	0,001	0	ενσωματωμένη

**Πίνακας 5:** Παρουσίαση των δειγμάτων που φέρουν την ενσωματωμένη μορφή του γονιδιώματος του ιού βάσει των τιμών και των δύο λόγων E1/E6 και E2/E6

### 3.2. Συγκριτικά αποτελέσματα των τιμών E1/E6 και E2/E6

Σε πολλά από τα δείγματα που αναλύθηκαν, οι τιμές των δύο λόγων συμφωνούσαν ως προς τη μορφή του γονιδιώματος του ιού. Παρ' όλα αυτά, ενδιαφέρον παρουσιάστηκε σε επτά δείγματα χαμηλού βαθμού δυσπλασίας στα οποία φάνηκε σημαντική διαφορά μεταξύ των τιμών των λόγων E1/E6 και E2/E6. Συγκεκριμένα, σε πέντε εξ αυτών, η τιμή του λόγου E2/E6 έδειξε παρουσία της μικτής μορφής του DNA του HPV16, ενώ η τιμή του λόγου E1/E6 έδειξε παρουσία μόνο της επισωματικής μορφής (πίνακας 6). Αυτό ίσως να οφείλεται στο γεγονός ότι στα δείγματα αυτά, η ενσωμάτωση του γονιδιώματος του HPV16 έχει γίνει αποκλειστικά και μόνο μέσω ρήξης του E2 γονιδίου. Αντίθετα, σε δύο από τα τραχηλικά δείγματα χαμηλού βαθμού δυσπλασίας (PNL2, ATT54), η τιμή του λόγου E2/E6 φανέρωσε επισωματική μορφή του ιικού DNA, ενώ η τιμή του E1/E6 έδειξε μικτή μορφή. Αντίστοιχα, το γεγονός αυτό ίσως να οφείλεται στην ενσωμάτωση του γονιδιώματος του HPV16 αποκλειστικά μέσω ρήξης του E1 γονιδίου.

Βάσει των παραπάνω αποτελεσμάτων, φαίνεται η μικτή μορφή του DNA του HPV16 να απαντάται στα παραπάνω τραχηλικά δείγματα με αποτέλεσμα να συμπεραίνεται ότι η ενσωμάτωση του γονιδιώματος του HPV16 πιθανώς να συμβαίνει μέσω ρήξης ή/και απαλοιφής των γονιδίων E1 και E2. Κατά συνέπεια, μπορεί να προταθεί ότι θα έπρεπε να λαμβάνεται υπόψη η τιμή και των δύο λόγων E1/E6 και E2/E6 ώστε να αναγνωριστεί με περισσότερη ακρίβεια η μορφή του ιικού γονιδιώματος. Ειδικότερα στις χαμηλού βαθμού δυσπλασίες όπου και αναφέρθηκαν ενσωματώσεις του HPV16 μέσω ρήξης του γονιδίου της E1.

<b>Δείγμα</b>	<b>Βαθμός αλλοίωσης</b>	<b>E2/E6</b>		<b>E1/E6</b>	
		Τιμή	Μορφή	Τιμή	Μορφή
PNL2	Χαμηλός	0,98	Επισωματική	0,88	Μικτή
PNL3	Χαμηλός	0,46	Μικτή	0,98	Επισωματική
ATT8	Χαμηλός	0,23	Μικτή	0,98	Επισωματική
ATT18	Χαμηλός	0,07	Μικτή	0,98	Επισωματική
ATT12	Χαμηλός	0,03	Μικτή	0,98	Επισωματική
ATT46	Χαμηλός	0,4	Μικτή	1	Επισωματική
ATT54	Χαμηλός	0,97	Επισωματική	0,76	Μικτή
747	Χαμηλός	0	Ενσωματωμένη	0	Ενσωματωμένη

**Πίνακας 6:** Φυσική κατάσταση και τιμές των λόγων E1/E6 και E2/E6 του HPV16 .

## Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ενσωμάτωση του ιού HPV στο γονιδίωμα του ξενιστή αποτελεί βαρυσήμαντο φαινόμενο όσον αφορά την εξέλιξη της ασθένειας σε καρκινογένεση και έχει φανεί να συμβαίνει σε σχετικά πρώιμο στάδιο κατά την ανάπτυξη της κακοήθειας στον τράχηλο της μήτρας (Arias-Pulido et al., 2006, Cricca et al., 2009). Η παρουσία των ενσωματωμένων ογκογόνων αλληλουχιών (E6 ή/και E7) πιθανώς προσδίδει στο μολυσμένο επιθήλιο αυξητικό πλεονέκτημα συμβάλλοντας έτσι σε υψηλότερο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και σε γενωμική αστάθεια με αποτέλεσμα τις περαιτέρω γενετικές αλλοιώσεις (Kessis, T. D. et al., 1996). Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκαν εξήντα ένα προκαρκινικά και οκτώ καρκινικά κλινικά δείγματα, θετικά στον ιό HPV16. Στα δείγματα αυτά, μέσω της τεχνικής της PCR πραγματικού χρόνου, υπολογίστηκαν οι τιμές των λόγων E1/E6 και E2/E6 ώστε να διευκρινιστεί η φυσική κατάσταση του γονιδιώματος του ιού. Για τον σκοπό αυτό, αρχικά πραγματοποιήθηκε χαρτογράφηση των γονιδίων E1 και E2 ώστε να προσδιοριστούν οι κοινές θέσεις ρήξης του γονιδιώματος του HPV16 και έπειτα, για τον ποσοτικό προσδιορισμό των γονιδίων E1 και E2, χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές που στοχεύουν τις θέσεις ρήξης, έτσι ώστε να προσδιοριστεί με μεγαλύτερη ακρίβεια η μορφή του γονιδιώματος του ιού. Στο γονίδιο E6 οι εκκινητές στόχευαν τις πλέον συντηρημένες αλληλουχίες του γονιδίου (Tsakogiannis et al., 2012, 2013, 2014).

Αρκετές μελέτες έχουν εξετάσει τη φυσική κατάσταση του γονιδιώματος του HPV16 μέσω του λόγου E2/E6, αποδεικνύοντας ότι η τιμή του αποτελεί σημαντικό μοριακό δείκτη για την αξιολόγηση του κινδύνου

προόδου της ασθένειας, από βαθμό CIN I, II και III σε καρκίνο του τραχήλου της μήτρας (Hudelist et al., 2004, Cricca et al., 2007, Briolat et al., 2007, Li et al., 2008, Boulet et al., 2009, Theelen et al., 2013). Εν ολίγοις, στις μελέτες αυτές, η ενσωμάτωση του ιικού γονιδιώματος καθορίστηκε μόνο βάσει ρήξης περιοχής του E2 γονιδίου, καθώς το γονίδιο E1 δεν μελετήθηκε. Όμως, έχειδειχθεί ότι η ρήξη και των δύο αυτών γονιδίων εμπλέκεται κατά την ενσωμάτωση σε περιπτώσεις CIN υψηλού βαθμού, ενώ σε περιπτώσεις CIN χαμηλού βαθμού εμπλέκεται μόνο το γονίδιο E1 (Cricca et al., 2009). Στην παρούσα μελέτη προέκυψε ότι ρήξη του γονιδίου E2 εμπλέκεται αποκλειστικά σε δείγματα τα οποία έχουν χαρακτηριστεί ως υψηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακή δυσπλασία και σε περιπτώσεις καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Επιπλέον, δεν καταγράφηκε καμία θέση ρήξης του γονιδίου E2 σε δείγματα χαμηλού βαθμού αλλοίωσης. Αντίθετα, η χαρτογράφηση του γονιδίου E1 έδειξε ότι ρήξη του εντοπίζεται σε δείγματα χαμηλού και υψηλού βαθμού αλλοίωσης αλλά και σε περιπτώσεις καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Συμπερασματικά, μόνο η ρήξη του E1 εμπλέκεται σε δείγματα χαμηλού βαθμού αλλοίωσης. Λαμβάνοντας υπόψη τη συχνότητα ρήξης του σε δείγματα χαμηλού βαθμού αλλοίωσης, προτάθηκε ότι η περιοχή του E1 αποτελεί σημαντικό σημείο του γονιδιώματος του ιού, για τον περαιτέρω προσδιορισμό της μορφής του γονιδιώματος του HPV16 σε χαμηλού βαθμού δυσπλασίες.

Προηγούμενες μελέτες έχουν αναφέρει ότι η ενσωμάτωση του ιικού γονιδιώματος είναι ένα συμβάν που εμφανίζεται αποκλειστικά σε υψηλού βαθμού αλλοιώσεις και καρκίνο (Tonon et al., 2001, Hudelist et al., 2004), ενώ άλλες μελέτες αναφέρουν την πρώιμη ενσωμάτωση του ιού σε χαμηλού βαθμού δυσπλασίες (Andersson et al., 2005, Kulmala et al., 2006, Cricca et al., 2007). Η ανάλυση του λόγου των τιμών E2/E6 και E1/E6 στην παρούσα μελέτη, έδειξε ότι η ενσωματωμένη μορφή του ιού βρίσκεται με μεγαλύτερη συχνότητα σε υψηλού βαθμού δυσπλασίες και σε περιπτώσεις καρκίνου, ενώ η επισωματική μορφή του DNA του ιού απαντάται αποκλειστικά σε χαμηλού βαθμού. Επιπλέον, αποδείχτηκε ότι δείγματα χαμηλού και υψηλού βαθμού σχετίζονται σημαντικά με τη μικτή μορφή του γονιδιώματος του ιού ( $\chi^2$ ,  $P < 0.001$ ) (Kulmala et al., 2006). Κατά συνέπεια, η ύπαρξη της μικτής αλλά και της αποκλειστικά ενσωματωμένης μορφής του γονιδιώματος του HPV16

στα δείγματα χαμηλού βαθμού δυσπλασίας, ενισχύει προηγούμενες έρευνες που πρότειναν ότι ο ιός ενσωματώνεται κατά τα πρώιμα στάδια του κύκλου ζωής του ιού (Andersson et al., 2005, Kulmala et al., 2006, Cricca et al., Huang et al., 2008). Βάσει των αποτελεσμάτων αυτών και όσων αφορούν τη ρήξη/απαλοιφή του γονιδίου E1 σε χαμηλού βαθμού αλλοιώσεις, συμπεραίνεται ότι, με την ανάλυση των τιμών μόνο του λόγου E2/E6, πιθανώς να χάνονται γεγονότα ενσωμάτωσης τα οποία οφείλονται σε ρήξεις του γονιδίου E1. Μάλιστα, το συμπέρασμα αυτό επιβεβαιώνεται αφού σε δύο περιπτώσεις χαμηλού βαθμού αλλοίωσης (PNL2, ATT54), ο λόγος E2/E6 υπέδειξε επισωμική μορφή του ιικού γονιδιώματος, ενώ η τιμή του λόγου E1/E6 υπέδειξε μικτή μορφή. Λαμβάνοντας υπόψη όλα αυτά τα δεδομένα, προτείνεται η ανάλυση των τιμών και των δύο λόγων ταυτόχρονα για τον καθορισμό της μορφής του ιικού γονιδιώματος, ειδικά όταν αναλύονται χαμηλού βαθμού δυσπλασίες.

Η σύγκριση των τιμών των δύο λόγων E1/E6 και E2/E6 στα δείγματα που εξετάστηκαν, παρείχε σημαντικές πληροφορίες για τον τρόπο ενσωμάτωσης του ιού στο κυτταρικό γονιδίωμα. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκαν περιπτώσεις στις οποίες προσδιορίστηκε η συνύπαρξη ξεχωριστών κατηγοριών DNA του HPV16 αφού στο ίδιο τραχηλικό δείγμα και οι δύο λόγοι E1/E6 και E2/E6 υπέδειξαν τη μικτή μορφή του DNA. Με λίγα λόγια, το επισωμικό DNA του ιού συνυπάρχει με ενσωματωμένα μόρια HPV16 στο γονιδίωμα του ξενιστή, κάποια από τα οποία υπέστησαν ρήξη στο γονίδιο E1 και κάποια στο E2. Το γεγονός αυτό ίσως να αποτελεί σημαντική ένδειξη για την ύπαρξη πολλαπλών θέσεων ενσωμάτωσης του ιού στο κυτταρικό DNA. Άλλωστε, έχουν ήδη αναφερθεί πολλαπλές ενσωματώσεις του γονιδιώματος του ιού σε καρκινικές κυτταρικές σειρές και σε δείγματα καρκίνου του τραχήλου της μήτρας (Yu et al., 2005, Li et al., 2013, Xu et al., 2013, Akagi et al., 2014). Η ανακάλυψη πολλαπλών γεγονότων ενσωμάτωσης σε δείγματα χαμηλού και υψηλού βαθμού αλλοίωσης είναι πιθανό να παρέχει πολύτιμες πληροφορίες για την πρόοδο μιας δυσπλασίας σε καρκίνο.

Καταλήγοντας, ενώ μέχρι στιγμής για τον προσδιορισμό της μορφής του γονιδιώματος του ιού πραγματοποιούνταν μόνο ανάλυση του λόγου E2/E6, στην παρούσα εργασία αναλύθηκαν ταυτόχρονα οι τιμές και των δύο λόγων E2/E6 και E1/E6 για ακριβέστερο αποτέλεσμα. Γνωρίζοντας ήδη πως η



ενσωμάτωση του γονιδιώματος του HPV16 στο χρωμόσωμα του ξενιστή, αποτελεί κομβικό σημείο στην πορεία προς την καρκινογένεση, ο υπολογισμός των λόγων E2/E6 και E1/E6 συνιστά ένα υποψήφιο προγνωστικό εργαλείο το οποίο παρέχει πολύτιμες πληροφορίες για την φυσική κατάσταση και την ενσωμάτωση του HPV16 στα εξεταζόμενα δείγματα του τραχήλου της μήτρας.

## E. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

Akagi K, Li J, Broutian TR, Padilla-Nash H, Xiao W, Jiang B, Rocco JW, Teknos TN, Kumar B, Wangsa D, He D, Ried T, Symer DE, Gillison ML (2014) Genome-wide analysis of HPV integration in human cancers reveals recurrent, focal genomic instability. 24(2):185-199

Amin AA, Titolo S, Pelletier A, Fink D, Cordingley MG, Archambault J (2000) Identification of domains of the HPV11 E1 protein required for DNA replication in vitro. Virology 272(1):137-150

Andersson S, Safari H, Mints M, Lewensohn-Fuchs I, Gyllensten U, Johansson B (2005) Type distribution, viral load and integration state of high-risk human papillomaviruses in pre-stages of cervical cancer (CIN). Br J Cancer 92:2195-2200

Arias-Pulido H, Peyton CL, Joste NE, Vargas H, Wheeler CM (2006) Human papillomavirus type 16 integration in cervical carcinoma in situ and in invasive cervical cancer. J Clin Microbiol 44(5):1755-1762

Artandi SE, Attardi LD (2005) Pathways connecting telomeres and p53 in senescence, apoptosis, and cancer. Biochem Biophys Res Commun 331:881-890

**Ashrafi GH, Haghshenas MR, Marchetti B, O'Brien PM, Campo MS (2005)** E5 protein of human papillomavirus type 16 selectively downregulates surface HLA class I. Int J Cancer 113(2):276-283

Badaracco G, Venuti A, Sedati A, Marcante ML (2002) HPV16 and HPV18 in genital tumors: Significantly different levels of viral integration and correlation to tumor invasiveness. *J Med Virol* 67:574–582

Baker CC, Howley PM (1987) Differential promoter utilization by the bovine papillomavirus in transformed cells and productively infected wart tissues. *EMBO J* 6(4):1027-1035

Baker TS, Newcomb WW, Olson NH, Cowser LM, Olson C, Brown JC (1991) Structures of bovine and human papillomaviruses. Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction. *Biophys J* 60(6):1445-1456

Barbaresi S, Cortese MS, Quinn J, Ashrafi GH, Graham SV, Campo MS (2010) Effects of human papillomavirus type 16 E5 deletion mutants on epithelial morphology: functional characterization of each transmembrane domain. *J Gen Virol* 91(Pt 2):521-530

Bedell MA, Hudson JB, Golub TR, Turyk ME, Hosken M, Willbanks GD, Laimins LA (1991) Amplification of human papillomavirus genomes in vitro is dependent on epithelial differentiation. *J Virol* 65(5):2254-2260

Bergant Marusic M, Ozbun MA, Campos SK, Myers MP, Banks L (2012) Human papillomavirus L2 facilitates viral escape from late endosomes via sorting nexin 17. *Traffic* 13(3):455-467

Bergvall M, Melendy T, Archambault J (2013) The E1 proteins. *Virology* 445(1-2):35-56

Bernard BA, Bailly C, Lenoir MC, Darmon M, Thierry F, Yaniv M (1989) The human papillomavirus type 18 (HPV18) E2 gene product is a repressor of the HPV18 regulatory region in human keratinocytes. *J Virol* 63(10):4317-4324

Bernard HU (2013) Regulatory elements in the viral genome. *Virology* 445(1-2):197-204

Bernard HU, Burk RD, Chen Z, van Doorslaer K, Hausen H, de Villiers EM (2010) Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology* 401:70-79

Bernard. H. U. (1994). Coevolution of papillomaviruses and human populations. *Trends Microbiol.* 2: 140-143

Boshart M, Gissman L, Ikenberg H, Kleinheinz A, Scheurlen W, zur Hausen H (1984) A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *EMBO J* 3(5):1151-1157

Boulet G, Horvath C, Vanden Broeck D, Sahebali S, Bogers J (2007) Human papillomavirus: E6 and E7 oncogenes. *Int J Biochem Cell Biol* 39(11):2006-2011

Bravo IG, Alonso A (2004) Mucosal human papillomaviruses encode four different E5 proteins whose chemistry and phylogeny correlate with malignant or benign growth. *J Virol* 78:13613–13626

Buck CB, Day PM, Trus BL (2013) The papillomavirus major capsid protein L1. *Virology* 445(1-2):169-174

Buck CB, Pastrana DV, Lowy DR, Schiller JT (2004) Efficient intracellular assembly of papillomaviral vectors. *J Virol.* 78:751-757

Bzhalava D, Guan P, Franceschi S, Dillner J, Clifford G (2013) A systematic review of the prevalence of mucosal and cutaneous human papillomavirus types. *Virology* 445(1-2):224-231

Johansson C, Somberg M, Li X, Backstrom Winqvist E, Fay J, Ryan F, Pim D, Banks L, Schwartz S (2012) HPV-16 E2 contributes to induction of HPV-16

late gene expression by inhibiting early polyadenylation EMBO J., 31 pp. 3212–3227

Casas I, Powell L, Klapper PE, Cleator GM (1995) New method for the extraction of viral RNA and DNA from cerebrospinal fluid for use in the polymerase chain reaction assay. J Virol Methods 53:25-36

Castella S, Burqin D, Sanders CM (2006) Role of ATP hydrolysis in the DNA translocase activity of the bovine papillomavirus (BPV-1) E1 helicase. Nucleic Acids Res 34(13):3731-3741

Chan SY, Bernard HU, Ong CK, Chan SP, Hofmann B, Delius H (1992) Phylogenetic analysis of 48 papillomavirus types and 28 subtypes and variants: a showcase for the molecular evolution of DNA viruses. J Virol 66:5714-5725

Chen CM, Shyu MP, Au LC, Chu HW, Cheng WT, Choo KB (1994) Analysis of deletion of the integrated human papillomavirus 16 sequence in cervical cancer: a rapid multiplex polymerase chain reaction approach. J Med Virol 44(2):206-211

Chen Z, Fu L, Herrero R, Schiffman M, Burk RD (2007) Identification of a novel human papillomavirus (HPV97) related to HPV18 and HPV45. Int. J. Cancer, 121 pp. 193–198

Chin MT, Hirochika R, Hirochika H, Broker TR, Chow LT (1988) Regulation of human papillomavirus type 11 enhancer and E6 promoter by activating and repressing proteins from the E2 open reading frame: Functional and biochemical studies. J Virol 62(8):2994-3002

Choe J, Vaillancourt P, Stenlund A, Botchan M (1989) Bovine papillomavirus type 1 encodes two forms of a transcriptional repressor: Structural and functional analysis of new viral cDNAs. J Virol 63(4):1743-1755

Ciuffo G (1907) Innesto positivo con filtrato di verruca volgare. Giorn Ital Mal Venereol 48:12-17

Conrad, M, Bubb, VJ and Schlegel, R 1993, 'The human papillomavirus type 6 and 16 E5 proteins are membrane-associated proteins which associate with the 16-kilodalton pore-forming protein', **Journal of Virology**, vol. 67, pp.6170-6178.

Cricca M, Morselli-Labate AM, Venturoli S et al (2007) Viral DNA load, physical status and E2/E6 ratio as markers to grade HPV16 positive women for high-grade cervical lesions. Gynecol Oncol 106:549-557

Cricca M, Venturoli S, Leo E, Costa S, Musiani M, Zerbini M (2009) Disruption of HPV 16 E1 and E2 genes in precancerous cervical lesions. J Virol Methods 158(1-2):180-183

Culp TD and Christensen ND, 2004, 'Kinetics of in vitro adsorption and entry of papillomavirus virions, Virology, vol. 319, pp. 152-61.

Davy CE, Jackson DJ, Wang Q, Raj K, Masterson PJ, Fenner NF, Southern S, Cuthill S, Millar JBA, Doorbar J (2002) Identification of a G2 arrest domain in the E1<sup>E4</sup> protein of human papillomavirus type 16. J Virol 76(19):9806-9818

Day PM, Baker CC, Lowy DR, Schiller JT (2004) Establishment of papillomavirus infection is enhanced by promyelocytic leukemia protein (PML) expression. Proc Natl Acad Sci USA 101(39):14252-14257

de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, Zur Hausen H (2004) Classification of papillomaviruses. Virology 324:17-27

DiMaio D, Petti LM (2013) The E5 proteins. Virology 445:99-114

Doorbar J (2006) Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. Clin Sci (Lond) 110:525–541

Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stoler M, Broker TR, Stanley MA (2012) The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine* 5:F55-70

Durst M, Kleinheinz A, Hotz M, Gissmann L (1985) The physical state of human papillomavirus type 16 DNA in benign and malignant genital tumours. *J Gen Virol* 66 (Pt 7): 1515–1522

Egawa K (2003) Do human papillomaviruses target epidermal stem cells? *Dermatology* 207(3):251-254

Egawa N, Nakahara T, Ohno SI, Narisawa-Saito M, Yugawa T, Fujita M, Yamato K, Natori Y, Kiyono T (2012) The E1 protein of human papillomavirus type 16 is dispensable for maintenance replication of the viral genome. *J Virol* 86(6):3276-3283

Fehrmann F, Laimins LA (2003) Human papillomaviruses: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. *Oncogene* 22:5201–5207

Ferber MJ, Thorland EC, Brink AA, Rapp AK, Phillips LA, McGovern R, et al. (2003) Preferential integration of human papillomavirus type 18 near the c-myc locus in cervical carcinoma. *Oncogene* 22:7233–7242

Finnen RL, Erickson KD, Chen XS, Garcea RL (2003) Interactions between papillomavirus L1 and L2 capsid proteins. *J Virol* 77(8):4818-4826

Garcia-Vallve S, Alonso A, Bravo IG (2005) Papillomaviruses: different genes have different histories. *Trends Microbiol* 13:514–521

Gewin L., H. Myers, T. Kiyono, D.A. Galloway Identification of a novel telomerase repressor that interacts with the human papillomavirus type-16 E6/E6-AP complex *Genes Dev.*, 18 (18) (2004), pp. 2269–2282

Ghittoni R, Accardi R, Hasan U, Gheit T, Sylla B, Tommasino M (2010) *Virus Genes* 40(1):1-13

Giri I, Yanin M (1988) Structural and mutational analysis of E2 trans-activating proteins of papillomaviruses reveals three distinct functional domains. *EMBO J* 7(9):2823-2829

Gissman L, Boshart M, Durst M, Ikenberg H, Wagner D, zur Hausen H (1984) Presence of human papillomavirus in genital tumors. *J Invest Dermatol* 83(1 Suppl):26s-28s

Glover TW and Stein CK. (1987). *Am. J. Hum. Genet.*, 41, 882–890.

Glover TW and Stein CK. (1988). *Am. J. Hum. Genet.*, 43, 265–273

Hamid NA, Brown C, Gaston K (2009) The regulation of cell proliferation by the papillomavirus early proteins. *Cell Mol Life Sci* 66:1700-1717

Hebner CM, Laimins LA (2006) Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Rev Med Virol* 16(2):83-97

Hoffmann R, Hirt B, Bechtold V, Beard P, Raj K (2006) Different modes of human papillomavirus DNA replication during maintenance. *J Virol* 80(9):4431-4439

Hu Z, Zhu D, Wang W, Li W, Jia W, Zeng X, Ding W, Yu L, Wang X, Wang L, Shen H, Zhang C, Liu H, Liu X, Zhao Y, Fang X, Li S, Chen W, Tang T, Fu A, Wang Z, Chen G, Gao Q, Li S, Xi L, Wang C, Liao S, Ma X, Wu P, Li K, Wang S, Zhou J, Wang J, Xu X, Wang H, Ma D (2015) Genome-wide profiling of HPV integration in cervical cancer identifies clustered genomic hot spots and a potential microhomology-mediated integration mechanism. *Nat Genet.* 2015 Feb;47(2):158-63.

Huang LW, Choa SL, Lee BH (2008) Integration of human papillomavirus type-16 and type-18 is a very early event in cervical carcinogenesis. *J Clin*



Pathol 61:627-631 de Villiers EM (2013) Cross-roads in the classification of papillomaviruses. *Virology* 445(1-2):2-10

Huibregtse JM, Scheffner M, Howley PM (1991) A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18. *EMBO J* 10(13):4129-4135

Jablonska S, Dabrowski J, Jakubowicz K (1972) Epidermodysplasia verruciformis as a model in studies on the role of papovaviruses in oncogenesis. *Cancer Res* 32(3):583-589

Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D (2011) Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 61:69-90

Jeon S, Lambert PF (1995) Integration of human papillomavirus type 16 DNA into the human genome leads to increased stability of E6 and E7 mRNAs: implications for cervical carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:1654–1658

Kadaja M, Silla T, Ustav E, Ustav M (2009) Papillomavirus DNA replication – from initiation to genomic instability. *Virology* 384:360-368

Kajitani N, Satsuka A, Kawate A, Sakai H (2012) Productive Lifecycle of Human Papillomaviruses that Depends Upon Squamous Epithelial Differentiation. *Front Microbiol* 3:152

Kalantari M, Blennow E, Hagmar B, Johansson B (2001) Physical state of HPV16 and chromosomal mapping of the integrated form in cervical carcinomas. *Diagn Mol Pathol* 10: 46–54.

Kalantari M, Karlsen F, Kristensen G, Holm R, Hagmar B, Johansson B (1998) Disruption of the E1 and E2 reading frames of HPV 16 in cervical carcinoma is associated with poor prognosis. *Int J Gynecol Pathol* 17(2):146-153

Kessis TD, Connolly DC, Hedrick L, & Cho KR, (1996). Expression of HPV16 E6 or E7 increases integration of foreign DNA. *Oncogene*, Jul 18, Vol.13, No.2, pp. 427-31, PMID: 8710383

Kines RC, Thompson CD, Lowy DR, Schiller JT, Day PM (2009) The initial steps leading to papillomavirus infection occur on the basement membrane prior to cell surface binding. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(48):20458-20463

Kivi N, Greco D, Auvinen P, Auvinen E (2008) Genes involved in cell adhesion, cell motility and mitogenic signaling are altered due to HPV 16 E5 protein expression. *Oncogene* 27(18):2532-2541

Klaes R, Woerner SM, Ridder R, Wentzensen N, Duerst M, et al. (1999) Detection of high-risk cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer by amplification of transcripts derived from integrated papillomavirus oncogenes. *Cancer Res* 59: 6132–6136.

Klingelutz AJ, Foster SA, McDouqall JK (1996) Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature* 380(6569):79-82

**Kulmala SM, Syrjänen SM, Gyllensten UB, Shabalova IP, Petrovichev N, Tosi P, Syrjänen KJ, Johansson BC** (2006) Early integration of high copy HPV16 detectable in women with normal and low grade cervical cytology and histology. *J Clin Pathol* 59:513-517

Lambert PF, Spalholz BA, Howley PM (1987) A transcriptional repressor encoded by BPV-1 shares a common carboxy-terminal domain with the E2 transactivator. *Cell* 50(1):69-78

Lee D, Kim H, Lee Y, Choe J (1997) Identification of sequence requirement for the origin of DNA replication in human papillomavirus type 18. *Virus Res* 52(1):97-108

Lehr E, Hohl D, Huber M, Brown D (2004) Infection with Human Papillomavirus alters expression of the small proline rich proteins 2 and 3. *J Med Virol* 72(3):478-483

Li H, Yang Y, Zhang R, Cai Y, Yang X, Wang Z, Li Y, Cheng X, Ye X, Xiang Y, Zhu B (2013) Preferential sites for the integration and disruption of human papillomavirus 16 in cervical lesions. *J Clin Virol* 56(4):342-347

Li W, Wang W, Si M, Han L, Gao Q, Luo A, Li Y, Lu Y, Wang S, Ma D (2008) The physical state of HPV16 infection and its clinical significance in cancer precursor lesion and cervical carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 134:1355-1361

Longworth MS, Wilson R, Laimins LA (2005) HPV31 E7 facilitates replication by activating E2F2 transcription through its interaction with HDACs. *EMBO J* 24(10):1821-1830

Lu JZ, Sun YN, Rose RC, Bonnez W, McCance DJ (1993) Two E2 binding sites (E2BS) alone or one E2BS plus an A/T-rich region are minimal requirements for the replication of the human papillomavirus type 11 origin. *J Virol* 67(12):7131-7139

Lukaszuk K, Liss J, Wozniak I, Emerich J, Wojcikowski C (2003) Human papillomavirus type 16 status in cervical carcinoma cell DNA assayed by multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 41(2):608-612

M. El Mzibri, M. Attaleb, R. Ameziane El Hassani, M. Khyatti, L. Benbacer, M. M. Ennaji and M. Amrani (2012). Evaluation of p53, p16INK4a and E-Cadherin Status as Biomarkers for Cervical Cancer Diagnosis, Topics on Cervical Cancer With an Advocacy for Prevention, Dr. R. Rajamanickam (Ed.), ISBN: 978-953-51-0183-3,

Matovina M, Sabol I, **Grubisić G**, Gasperov NM, Grce M (2009) Identification of human papillomavirus type 16 integration sites in high-grade precancerous cervical lesions. *Gynecol Oncol* 113:120-127

McBride A. A., Oliveila J. G., McPhillips M. G. (2006). Partitioning viral genomes in mitosis: same idea, different targets. *Cell Cycle* 5, 1499–1502. [10.4161/cc.5.14.3094](https://doi.org/10.4161/cc.5.14.3094)

McBride AA (2008) Replication and partitioning of papillomavirus genomes. *Adv Virus Res* 72:155-205

McBride AA (2013) The Papillomavirus E2 proteins. *Virology* 445(1-2):57-79

McBride AA, Schlegel R, Howley PM (1988) The carboxy-terminal domain shared by the bovine papillomavirus E2 transactivator and repressor proteins contains a specific DNA binding activity. *EMBO J* 7(2):533-539

McIntosh PB, Laskey P, Sullivan K, Davy C, Wang Q, Jackson DJ, Griffin HM, Doorbar J (2010) E1--E4-mediated keratin phosphorylation and ubiquitylation: a mechanism for keratin depletion in HPV16-infected epithelium. *J Cell Sci* 123(Pt 16):2810-2822

Mohr IJ, Clark R, Sun S, Androphy EJ, MacPherson P, Botchan MR. *Science*. 1990 Targeting the E1 replication protein to the papillomavirus origin of replication by complex formation with the E2 transactivator. Dec 21;250(4988):1694-9. PMID: 2176744

Moody Cary A. & Laimins Laimonis A (2012) Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation, *Nature Reviews Cancer* 10, 550-560 (August 2010)

Morin G, Fradet-Turcotte A, Di Lello P, Bergeron –Labrecque F, Omichinski JG, Archambault J (2011) A conserved amphipathic helix in the N-terminal

regulatory region of the papillomavirus E1 helicase is required for efficient viral DNA replication. *J Virol* 85(11):5287-5300

Munger K, Baldwin A, Edwards KM, Hayakawa H, Nguyen CL, Owens M, Grace M, Huh K (2004) Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol* 78(21):11451-11460

Nagao S, Yoshinouchi M, Miyagi Y, Hongo A, Kodama J, Itoh S, Kudo T. Rapid and sensitive detection of physical status of human papillomavirus type 16 DNA by quantitative real-time PCR. *J Clin Microbiol.* 2002;40:863–867.

Orth G, Favre M, Croissant O. (1977) Characterization of a new type of human papillomavirus that causes skin warts. *J Virol.* 1977 Oct;24(1):108-20.

Ozbun MA, Meyers C (1997) Characterization of late gene transcripts expressed during vegetative replication of human papillomavirus type 31b. *J Virol* 71(7):5161-5172

Peter M, Stransky N, Couturier J, Hupe P, Barillot E, et al. (2010) Frequent genomic structural alterations at HPV insertion sites in cervical carcinoma. *J Pathol* 221: 320–330

Pett M, Coleman N (2007) Integration of high-risk human papillomavirus: a key event in cervical carcinogenesis? *J Pathol* 212: 356–367.

Pett MR, Herdman MT, Palmer RD, Yeo GSH, Shivji MK, Stanley MA, Coleman N (2006) Selection of cervical keratinocytes containing integrated HPV16 associates with episome loss and an endogenous antiviral response. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:3822–3827

Pyeon D, Pearce SM, Lank SM, Ahlquist P, Lambert PF (2009) Establishment of human papillomavirus infection requires cell cycle progression. *PLoS Pathog* 5(2):e1000318

Richards RI. (2001). Trends Genet., 17, 339–345

Roberts S, Ashmole I, Rookes SM, Gallimore PH (1997) Mutational analysis of the human papillomavirus type 16 E1 E4 protein shows that the C terminus is dispensable for keratin cytoskeleton association but is involved in inducing disruption of the keratin filaments. J Virol 71(5):3554-3562

Roman A, Munger K (2013) The papillomavirus E7 proteins. Virology 445(1-2):138-168

Sanders CM, Stenlund A (2000) Transcription factor-dependent loading of the E1 initiator reveals modular assembly of the papillomavirus origin melting complex. J Biol Chem 275(5):3522-3534

Saunier M, Monnier – Benoit S, Mauny F, Dalstein V, Briolat J, Riethmuller D, Kantelip B, Schwarz E, Mougin C (2008) HPV16 DNA load and physical state allow the identification of HPV16 infected women with high-grade lesions or cervical carcinoma. Clin. Microbiol. vol. 46, no. 11, 3678 – 5

Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, Howley PM (1993) The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. Cell 75(3):495-50

Schmitt A, Rochat A, Zeltner R, Borenstein L, Barrandon Y, Wettstein FO, Iftner T (1996) The primary target cells of the high-risk cottontail rabbit papillomavirus colocalize with hair follicle stem cells. J Virol 70(3):1912-1922

Schmitz M, Driesch C, Beer-**Grondke K, Jansen L, Runnebaum IB, Dürst M** (2012) Loss of gene function as a consequence of human papillomavirus DNA integration. Int J Cancer 131:E593-602

**Schmitz M, Driesch C, Jansen L, Runnebaum IB, Dürst M (2012)** Non-random integration of the HPV genome in cervical cancer. PLoS One 7:e39632

Shope RE, Hurst EW (1933) Infectious papillomatosis of rabbits; with a note on the histopathology. J Exp Med 58(5):607-624

Sotlar K, Diemer D, Dethleffs A, Hack Y, Stubner A, Vollmer N, Menton S, **Menton M, Dietz K, Wallwiener D, Kandolf R, Bültmann B.2004 a, 'Detection and typing of human papillomavirus by E6 nested multiplex PCR', Journal of Clinical Microbiology, vol. 42, pp. 3176-84.**

Stoppler MC, Straight SW, Tsao G, Schlegel R, McCance DJ (1996) The E5 gene of HPV-16 enhances keratinocyte immortalization by full-length DNA. *Virology* 223:251-254

Straight SW, Hinkle PM, Jewers RJ, McCance DJ (1993) The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 transforms fibroblasts and effects the down regulation of the epidermal growth factor receptor in keratinocytes. *J Virol* 67:4521-4532

Stubenrauch F, Leigh IM, Pfister H (1996) E2 represses the late gene promoter of human papillomavirus type 8 at high concentrations by interfering with cellular factors. *J Virol* 70(1):119-126

Sun Y, Han H, McCance DJ (1998) Active domains of human papillomavirus type 11 E1 protein for origin replication. *J Gen Virol* 79(Pt 7):1651-1658

Tachezy R., G. Dusan, A. Rector, A.B. Jenson, J.P. Sundberg, M. Van Ranst Cloning and genomic characterization of *Felis domesticus* papillomavirus type 1 *Virology*, 301 (2002), pp. 313–321

Teraï M, DeSalle R, Burk RD. Lack of canonical E6 and E7 open reading frames in bird papillomaviruses: *Fringilla coelebs* papillomavirus and *Psittacus erithacus* timneh papillomavirus *J. Virol.*, 76 (2002), pp. 10020–10023

Theelen W, Litjens RJ, Vinokurova S, Haesevoets A, Reijans M, Simons G, Smedts F, Herrington CS, Ramaekers FC, von Knebel Doeberitz M, Speel EJ, Hopman AH (2013) Human papillomavirus multiplex ligation-dependent

probe amplification assay for the assessment of viral load, integration, and gain of telomerase-related genes in cervical malignancies. *Hum Pathol* 2013 44:2410-2418.

Thiery F (2009) Transcription regulation of the papillomavirus oncogenes by cellular and viral transcription factors in cervical carcinoma. *Virology* 384:375-379

Thorland EC, Myers SL, Gostout BS, Smith DI (2003) Common fragile sites are preferential targets for HPV16 integrations in cervical tumors. *Oncogene* 22:1225-1237

Titolo S, Brault K, Majewski J, White PW, Archambault J (2003) Characterization of the minimal DNA binding domain of the human papillomavirus E1 helicase: fluorescence anisotropy studies and characterization of a dimerization-defective mutant protein. *J Virol* 77(9):5178-5191

Tsakogiannis D, Kyriakopoulou Z, Ruether IG, Amoutzias GD, Dimitriou TG, Diamantidou V, Kotsovassilis C, Markoulatos P.(2014) Determination of human papillomavirus 16 physical status through E1/E6 and E2/E6 ratio analysis. *Med Microbiol*. 2014 Dec;63(Pt 12):1716-23

Tsakogiannis D, Papadopoulou A, Kontostathi G, Ruether IG, Kyriakopoulou Z, Dimitriou TG, Orfanoudakis G, Markoulatos P.(2013) Molecular and evolutionary analysis of HPV16 E6 and E7 genes in Greek women. *J Med Microbiol*. 2013 Nov;62(Pt 11):1688-96

Tsakogiannis D, Ruether I, Kyriakopoulou Z, Pliaka V, Theoharopoulou A, Skordas V, Panotopoulou E, Nepka C, Markoulatos P (2012) Sequence variation analysis of the E2 gene of human papilloma virus type 16 in cervical lesions from women in Greece. *Arch Virol*. 2012 May;157(5):825-32.



Van Regenmortel MH, Fauquet CM, Bishop DH, Calisher CH, Carsten EB, Estes MK, Lemon SM, Maniloff J, Mayo MA, McGeoch DJ, Pringle CR, Wickner RB (2002) Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee for the Taxonomy of Viruses. Academic Press, New-York, San Diego

Vande Pol SB, Klingelhutz AJ (2013) Papillomavirus E6 oncoproteins. *Virology* 445(1-2):115-137

Venuti A, Paolini F, Nasir L, Corteggio A, Roperto S, Campo MS, Borzacchiello G (2011) Papillomavirus E5: the smallest oncoprotein with many functions. *Mol Cancer* 10:140

Vinokurova S, Wentzensen N, Kraus I, Klaes R, Driesch C, Melsheimer P, et al. (2008) Type-dependent integration frequency of human papillomavirus genomes in cervical lesions. *Cancer Res* 68:307-313

Wang JW, Roden RB (2013) L2, the minor capsid protein of papillomavirus. *Virology* 445(1-2):175-186

Wentzensen N, Vinokurova S, von Knebel Doeberitz M (2004) Systematic review of genomic integration sites of human papillomavirus genomes in epithelial dysplasia and invasive cancer of the female lower genital tract. *Cancer Res* 64: 3878–3884.

White PW, Pelletier A, Brault K, Titolo S, Welchner E, Thauvette L, Fazekas M, Cordingley MG, Archambault J (2001) Characterization of recombinant HPV6 and 11 E1 helicases: effect of ATP on the interaction of E1 with E2 and mapping of a minimal helicase domain. *J Biol Chem* 276(25):22426-22438

Winder DM, Pett MR, Foster N, et al. (2007) An increase in DNA double-strand breaks, induced by Ku70 depletion, is associated with human papillomavirus 16 episome loss and de novo viral integration events. *J Pathol* 213: 27-34

Xu B, Chotewutmontri S, Wolf S, Klos U, Schmitz M, Durst M, Schwarz E (2013) Multiplex Identification of Human Papillomavirus 16 DNA Integration Sites in Cervical Carcinomas. PLoS One 8(6):e66693

Yoshinouchi M, Hongo A, Nakamura K, Kodama J, Itoh S, Sakai H, and Kudo T. 1999. Analysis by multiplex PCR of the physical status of human papillomavirus type 16 DNA in cervical cancers. J. Clin. Microbiol. 37:3514-3517. Yu T, Ferber MJ, Cheung TH, Chung TK, Wong YF, Smith DI (2005) The role of viral integration in the development of cervical cancer. Cancer Genet Cytogenet 158:27-34

**Zanier K, M'Hamed Ould Sidi AO**, Boulade-Ladame C, Rybin V, Chappelle A, Atkinson A, Kieffer B, Trave G (2012) Solution structure analysis of the HPV16 E6 oncoprotein reveals a self-association mechanism required for E6-mediated degradation of p53. Structure 20(4):604-617

Zhao KN, Hengst K, Liu WJ, Liu YH, Liu XS, McMillan NA, Frazer IH (2000) BPV1 E2 protein enhances packaging of full-length plasmid DNA in BPV1 pseudovirions. Virology 272(2):382-393

Zheng ZM, Baker CC (2006) Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. Front Biosci 11:2286-2302

Ziegert C, Wentzensen N, Vinokurova S, Kisseljov F, Eienkel J, Hoeckel M, von Knebel Doeberitz M (2003) A comprehensive analysis of HPV integration loci in anogenital lesions combining transcript and genome-based amplification techniques. Oncogene 22(25):3977-3984

zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. (2000) J Natl Cancer Inst. 3;92(9):690-8.